



Erythropoïèse normale et pathologique, internalisation de c-Kit et morphologie du nucléole

Diane d' Allard

► To cite this version:

Diane d' Allard. Erythropoïèse normale et pathologique, internalisation de c-Kit et morphologie du nucléole. Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes - Paris V, 2013. Français. NNT : 2013PA05S026 . tel-00948122

HAL Id: tel-00948122

<https://theses.hal.science/tel-00948122>

Submitted on 17 Feb 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Paris Descartes (Paris 5)

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE ET BIOTECHNOLOGIE B2T

Année 2013

N° attribué par la bibliothèque

THESE

Pour l'obtention du Diplôme de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS 5

SPECIALITE : Hématologie et Oncologie

Présentée et soutenue publiquement par

Diane d'Allard

Le 12 septembre 2013

<p>Erythropoïèse normale et pathologique, internalisation de c-Kit et morphologie du nucléole</p>
--

Directeur de thèse : Pr Michaela Fontenay

JURY

Dr Isabelle Dusanter-Fourt	Présidente
Dr François Morlé	Rapporteur
Dr Paulo De Sepulveda	Rapporteur
Dr Nathalie Droin	Examineur
Dr Geneviève Courtois	Examineur

**« En essayant continuellement on finit par réussir.
Donc : plus ça rate, plus on a de chance que ça marche. »**

Jacques Rouxel

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury, qui ont bien voulu se pencher sur mon travail et le juger.

Merci **Isabelle Dusanter-Fourt**, d'avoir accepté de présider ce jury et d'avoir décalé de 24h ton départ au congrès annuel Jak/STAT, j'en suis particulièrement touchée. Tu as suivi de nombreuses étapes de ce travail, que tu connais donc largement, j'espère que tu vas apprécier ce manuscrit.

Un très grand merci à mes deux rapporteurs, **François Morlé** et **Paulo de Sepulveda**. Merci **François** pour nos nombreuses conversations scientifiques, à l'occasion du CHO pour c-Kit, de la SFH et de plusieurs réunions autour des ribosomes pour la morphologie du nucléole. Merci pour votre gentillesse et pour vos « félicitations » lors de la première lecture de ce manuscrit. Merci **Paulo** d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail, d'avoir lu avec autant d'attention ma thèse et de vos suggestions de corrections, qui l'ont rendu bien meilleur.

Merci également à **Nathalie Droin** et à **Geneviève Courtois** d'avoir accepté d'être examinatrices de ce travail, j'espère qu'il ne vous décevra pas.

Un grand merci à **Michaela Fontenay**, mon directeur de thèse, vous qui m'avez permis de réaliser ces travaux au sein de votre groupe de recherche.

Merci également à **Olivier Kosmider** qui a dirigé l'étude de c-Kit et de l'imatinib.

Merci à **Patrick Mayeux** et à **Catherine Lacombe** pour m'avoir permis d'intégrer leur équipe de recherche.

Je souhaite aussi remercier **Pierre-Emmanuel Gleizes**, pour nos nombreuses conversations autour du nucléole, pour son aide expérimental (même si je n'ai malheureusement pas eu le temps de tout faire) et ses encouragements. Vous m'avez fait aimer le ribosome et sa maison !

Mais ces trois années de thèse n'auraient pas été les mêmes sans tout ceux que j'ai rencontrés, croisés, côtoyés, appréciés...

Merci donc, et tout particulièrement, à ma voisine de bureau et amie (de galère), **ma Louloute**, alias **Bérengère**. Sans toi ces années auraient été bien tristes. Je suis ravie d'avoir partagé ce bureau avec toi, d'avoir rédigé avec toi, de soutenir presque avec toi (à 2 jours près... !!!), d'avoir eu bien plus que des conversations et des relations scientifiques avec toi. Merci pour notre cafetière commune, ta boîte à pamplemousse, ta transformation en wiki-synonymes, le gobelet Sigma... et j'en passe.

Il y a une autre personne sans qui les deux dernières années auraient sans doute été beaucoup moins sympas. Merci **Elise**, pour ta gentillesse, ta présence, tes paroles réconfortantes, ta douceur, ton aide et pour tant d'autres choses encore.

A elles deux...MERCI MERCI MERCI MERCI !!!!!!!!!!!

Mais il y a aussi tout les autres...

Merci mon **p'tit Kev'**, mon copian MRT, pour toutes tes réponses à mes questions plus ou moins scientifiques, pour ta gentillesse et ton humour... Bon courage pour la dernière année, allez, tu tiens le bon bout !

Merci à toute **l'équipe Porteu** passée et présente : Françoise, pour ton regard critique, Murielle, Patrycja, Soizic, Nathalie, Wissem, Alba (l'albanaise), Richard, Daniela, JM, j'en oublie sûrement...

Merci à toute **l'équipe EPO** : Fred, pour tes nombreux et précieux conseils sur la culture des rouges, Yaelle, Mireille, Maud, Sarah, Merieme, Gabriel, Pierre (bonne chance pour ton concours et pour les trois années qui t'attendent, tu vas voir, ça va être cool !!!).

Merci aussi à **l'équipe LAM** : **Alexa**, pour tous ces week-ends en ta compagnie, j'étais toujours plutôt contente de venir, je savais que je ne serai pas seule !!! Lise, Nathalie, Pierre, Marie-Anne, Adrien, Sylvain... pour toutes les questions médicales auxquelles vous avez répondu, sans oublier Laury, la seule non médecin, bon courage pour la thèse !!!

Merci à **Lamya** et **Ségolène**, pour votre gentillesse et la gestion de la cafetière commune !

Merci également à toute **l'équipe Dusanter** : Luana, Fabio, Aurore, Audrey, Yasmine, Nino (pour les grains, entre autre), Evelyne...

A tous les membres passés et présents de mon équipe, à **Julie** qui m’a précédée sur c-Kit et qui m’a accompagnée le premier mois de ma thèse, à **Sandrine**, pour le petit grain de folie apporté au 7^{ème} étage de Gustave Roussy, mais aussi au 4^{ème} de Dausset, à **Gaelle**, pour tous les tri 34 et ton amitié, à **Julien, Anne, Momo** et **Audrey**, qui se sont succédés à Dausset, à **Célia** et **Anna** pour leur gentillesse et la poursuite de la ribomique... mais aussi aux nombreux stagiaires, **Soraya, Emilie, Pauline...** qui ont amené de l’eau au moulin. Sans oublier **Virginie**, merci pour ton amitié et ta gentillesse, je te lègue mon bureau et ma tour, prends en soin, et tu vas voir, le 7^{ème} étage c’est bien !

Aux membres des différentes plateformes de l’institut : merci **François, Cédric, Virginie** et **Marjorie**, pour votre aide et votre investissement dans l’analyse SILAC. **Alain** pour les heures passées devant le microscope, c’est fou tout ce qu’on peut voir dans une cellule !!! Merci **Pierre ; Béatrice**, pour m’avoir initiée au STORM et pour ton aide technique, **Thomas**, pour tout ce que je t’ai demandé (dans l’urgence, sinon c’est pas drôle) et pour tout le reste, je suis contente que le Vacqueyras t’ait plu !

Mais il n’y a pas que le travail !!!!

Alors merci à tous les autres : **Arnaud**, pour ton écoute, ton soutien, ta gentillesse, ton amitié et pour toutes les clopes qu’on a fumées ensemble, **Alessia**, ma Napolitaine préférée, **Houcine**, qui mime si bien l’ATP et pour toutes nos conversations autour de c-kit, l’autre **Arnaud, Micka, Bruno, Cédric, Camille, Greg** (hihihi, niçois, comme moi !), **Nico** et l’autre **Nico, Steph, Laura...** et j’en oublie.

Un merci tout spécial aux Cheynier... Merci **Rosa, Amandine** et **Sandrine**, c’était vraiment trop cool de vous voir tous les jours (et même les weekends !). Le meuble vous souhaite le « bonjour » !!! **Maga**, pour toutes ces soirées à deux.

Merci **Hubert** pour ton oreille et ton amitié (comme quoi, les opposés s’attirent !)

Merci **Rémy** !

Mais aussi aux autres lyonnais, entre autres **Mailys** (« pipet me forever ! ») et **Maya**, pour tous les bons moments passés ensemble.

Mais qui dit Lyon dit aussi **Pascale** et **Gérard...** Merci à vous deux !

Merci à tous ceux qui m'ont soutenu sans trop comprendre ce que je faisais. Merci à **Agnès B**, mais surtout MERCI à mes copines niçoises : **Aurore, Alex, Nelly et Flav'**, d'être là, d'avoir écouté toutes mes histoires de labo, de m'avoir soutenue, d'avoir su me vider la tête, d'être présentes malgré la distance ou des emplois du temps bien trop chargés !!! On se retrouve bientôt autour d'un verre de vin !

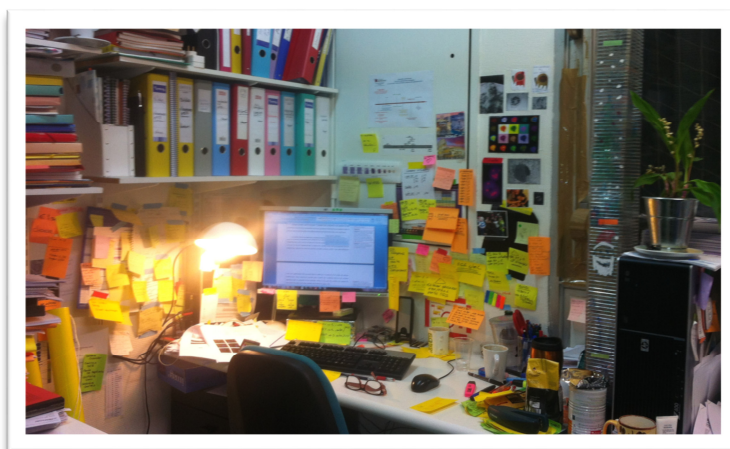
Merci **Fabien**, pour ta loquacité, entre autre !

Merci **Sof** de ne jamais râler quand je squate chez vous et de nous supporter Marion et moi. Merci **Renaud** pour notre maison de campagne, c'est trop bien de se mettre au vert de temps à autre... mais la bête, c'est sympa aussi !

Enfin, un très GRAND MERCI à toute ma famille, pour leur soutien moral sans faille et pour avoir essayé de comprendre ce à quoi je passais tout mon temps ! A mes **grands parents**, à mes **parents** pour leur aide psychologique et financière, et bien évidemment à mes sœurs **Claire et Marion** ! C'est fini !!!!!!!!!!!

Voilà, trois ans, c'est long... la thèse est un apprentissage tant scientifique que personnel ; je la dois à toutes les personnes citées ci-dessus, mais également à celles que j'ai oubliées de mentionner.

Enfin, je voudrais vous faire partager un bout de mon quotidien. En voilà donc un petit aperçu, enjoy...



« Si un bureau en désordre dénote un esprit brouillon, que dire d'un bureau vide ? »
(Albert Einstein)

RESUME

L'érythropoïèse est le processus qui permet à la production d'hématies à partir d'une cellule souche hématopoïétique. La différenciation érythroïde implique des changements morphologiques, en partie liés à la perte d'expression membranaire du récepteur à activité tyrosine kinase de classe III, c-Kit. En réponse à son ligand, le SCF, c-Kit est activé puis internalisé et dégradé par la voie du protéasome, via l'ubiquitine E3-ligase c-Cbl, ou par la voie lysosomale suite à une endocytose.

Dans la première partie de ce travail, nous avons pu mettre en évidence qu'en absence de SCF et en réponse à un inhibiteur de tyrosine kinase, l'imatinib, les érythroblastes cultivés *ex vivo* perdent l'expression membranaire de c-Kit et accélèrent leur entrée en différenciation terminale. Au vu de ces observations, nous avons cherché à comprendre les mécanismes impliqués. Sur un modèle de cellules érythroleucémiques dépendantes de l'érythropoïétine, mais exprimant de manière endogène c-Kit, nous avons montré que l'imatinib induit une internalisation du récepteur ainsi que sa dégradation par la voie lysosomale et de manière indépendant de c-Cbl. De plus, nous avons montré que cet effet est réversible et que l'imatinib ne bloque pas la réexpression de c-Kit après son internalisation en réponse au SCF. Des marquages métaboliques ont permis de montrer que l'imatinib ne modifie ni la synthèse ni la maturation de c-Kit et que le profil phospho-tyrosine des cellules traitées à l'imatinib est globalement inchangé. Enfin, nous avons montré que la fixation de l'imatinib à la poche catalytique de c-Kit est indispensable à son internalisation, et par conséquent à sa dégradation. Il apparaît donc que l'imatinib lève l'auto-inhibition de c-Kit, qui semble nécessaire pour son maintien à la membrane.

Dans la seconde partie de ce travail, nous nous sommes intéressés aux changements morphologiques subis par les nucléoles, lieu de la biogenèse des ribosomes, au cours de différenciation des érythroblastes. L'étude de la taille et du potentiel prolifératif des cellules, ainsi que l'analyse morphologique des nucléoles, nous a permis de confirmer que la réduction de taille des cellules est contemporaine d'un ralentissement de leur prolifération ainsi que de la réduction du volume et de la surface du composé granulaire (CG), « matrice » du nucléole. En microscopie électronique, nous montrons la persistance des CG en fin de maturation. Enfin, nous avons également étudié l'évolution des nucléoles dans un contexte pathologique de syndromes myélodysplasiques de faible risque, qui se caractérisent par une hématopoïèse inefficace. Nous observons que les cellules pathologiques immatures ont des CG plus volumineux que les cellules normales immatures, et qu'au cours de la différenciation, la morphologie des nucléoles est identique entre les cellules normales et pathologiques.

En conclusion, ce travail a permis de décrire 1) le mécanisme d'internalisation d'un récepteur à activité tyrosine kinase de classe III, c-Kit par un inhibiteur de tyrosine kinase, l'imatinib et 2) la morphologie du nucléole au cours de la différenciation érythroïde normale et pathologique des syndromes myélodysplasiques de faible risque.

Mots clés : différenciation érythroïde – c-Kit – imatinib – nucléoles – SMD

SOMMAIRE

RESUME.....	VI
SOMMAIRE	VII
LISTE DES ILLUSTRATIONS	XII
ABREVIATIONS	XIV

Introduction	1
I. Généralités sur l'hématopoïèse	2
A. Définition	2
B. Les différentes étapes de l'hématopoïèse.....	2
1. Les cellules souches hématopoïétiques.....	2
2. Les progéniteurs.....	3
3. Les précurseurs	4
4. Les cellules matures	4
II. L'érythropoïèse	4
A. Généralités sur l'érythropoïèse	4
B. La différenciation érythroïde	5
1. Les progéniteurs érythroïdes	5
2. Les précurseurs érythroïdes	7
3. Les réticulocytes et les globules rouges.....	7
4. L'ilot érythroblastique.....	9
III. Cytokines régulatrices de l'érythropoïèse	12
A. Le couple SCF/c-Kit.....	12
1. Le Stem Cell Factor (SCF)	12
a) Le gène du SCF.....	12
b) La protéine	13
2. c-Kit, le récepteur du SCF	14
a) Le gène de c-Kit	14
b) Récepteurs à activité tyrosine kinase, généralités.....	16

c)	La protéine	17
d)	Les variants alternatifs de c-Kit	19
3.	Activation du récepteur par son ligand	20
a)	Fixation du ligand et homodimérisation du récepteur	20
b)	Activation et autophosphorylation du récepteur	21
4.	c-Kit et signalisation cellulaire	23
a)	La voie PI3K/AKT	23
b)	La voie JAK/STAT	25
c)	La voie des MAP kinases	26
d)	La famille des Src Kinase (SK)	28
5.	Régulation négative de c-Kit	30
a)	Déphosphorylation des tyrosines	30
b)	Phosphorylation des sérines	30
c)	Internalisation et dégradation de c-Kit	30
6.	Le couple SCF/c-Kit dans l'érythropoïèse	32
7.	Fonctions non érythroïdes du couple SCF/c-Kit	34
a)	Maturation et fonctions des mastocytes	34
b)	Mélanocytogenèse et pigmentation	35
c)	Motricité des cellules interstitielles de Cajal	35
d)	Gamétogenèse	36
B.	Le couple EPO/R-EPO	36
1.	L'érythropoïétine (EPO)	36
2.	R-EPO, le récepteur de l'EPO	38
3.	Liaison EPO/R-EPO et signalisation en aval	40
4.	Régulation de la signalisation EPO/R-EPO	42
C.	Synergie R-EPO / c-Kit dans l'érythropoïèse	44
IV.	La biogenèse des ribosomes : une machinerie essentielle à l'érythropoïèse	46
A.	Généralités sur la biogenèse du ribosome	46
B.	Conséquences d'un défaut de biogenèse des ribosomes en pathologie humaine...	49
1.	Ribosomopathies constitutionnelles	49
2.	Une ribosomopathie acquise : Le syndrome 5q-	51

C.	Conséquence d'un défaut de biogenèse des ribosomes : Activation de p53.....	52
1.	La protéine p53 et sa régulation par HDM2	52
2.	p53 et stress ribosomique	53
V.	Erythropoïèse pathologique des syndromes myélodysplasiques de faible risque non 5q-	54
A.	Définition et épidémiologie	54
B.	Classification et score de <i>pronostic</i>	54
1.	La classification OMS	54
2.	Epidémiologie, pronostic et score IPSS.....	56
C.	Physiopathologie des SMD	57
1.	Anomalies clonales de la cellule souche hématopoïétique :.....	57
2.	Apoptose des progéniteurs médullaires.....	58
3.	Défaut de différenciation érythroïde.....	59
4.	Implication des cytokines régulatrices de l'érythropoïèse dans la physiopathologie des SMD.....	60
a)	EPO/R-EPO.....	60
b)	SCF/c-Kit	61
	Résultats I.....	62
I.	Contexte scientifique	63
A.	c-Kit et pathologies	63
1.	Boucle d'activation autocrine	63
2.	Mutations inhibitrices de c-Kit.....	64
3.	Mutations activatrices de c-Kit	64
a)	Mutations du domaine extracellulaire, exemple des LAM à CBF	64
b)	Mutations du domaine juxtamembranaire, exemple des GIST	66
c)	Mutations du domaine intracellulaire, exemple de la mastocytose systémique..	68
B.	c-Kit et thérapeutique : les inhibiteurs de tyrosine kinase.....	70
1.	Généralités sur les inhibiteurs de tyrosine kinase	70
2.	L'imatinib	71
a)	Description	71

b) c-Kit et imatinib	72
c) Mécanismes de résistance, exemple du mutant T670I	73
II. Introduction de l'étude	73
III. Résultats	74
IV. Conclusion	76
V. Perspectives	77
VI. Article	79
Résultats II.....	95
I. Contexte Scientifique	96
A. Structure et morphologie du nucléole.....	96
B. Nucléole et défaut de biogenèse du ribosome	99
C. Nucléole et cycle cellulaire	100
D. Nucléole et différenciation érythroïde	101
II. Introduction de l'étude	102
III. Matériel et méthode	103
A. Culture cellulaire	103
B. Cytométrie en flux	104
C. Détection de la protéine NPM1 en immunofluorescence.....	104
D. Analyse des marquages immunofluorescents de NPM1 et reconstruction des nucléoles en 3D.....	104
E. Microscopie électronique	105
IV. Résultats et discussion	105
A. Morphologie du nucléole dans les cellules HeLa traitées à l'actinomycine D.....	105
1. Microscopie électronique	106
2. Immunofluorescence de la protéine NPM1.....	106
B. Evolution de la morphologie des nucléoles au cours de la différenciation érythroïde normale.....	108
C. Morphologie nucléolaire au cours de la différenciation érythroïde pathologique des SMD	115
D. Persistance du composé granulaire au cours de la différenciation érythroïde ..	120
1. Microscopie photonique.....	120

2. Microscopie électronique	122
V. Perspectives	124
 Discussion générale	129
Bibliographie	132
Annexe I	161
Annexe II	163
RESUME.....	176

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Schéma de l'hématopoïèse	3
Figure 2 : Schéma de l'érythropoïèse.....	5
Figure 3 : Culture de progéniteurs hématopoïétiques en culture semi-solide.....	6
Figure 4 : Enucléation en microscopie électronique (Yoshida <i>et al.</i> , 2005).....	8
Figure 5 : L'îlot érythroblastique	10
Figure 6 : Du gène à la protéine, schéma des voies de synthèse du SCF (d'après Reber <i>et al.</i> , 2006).....	13
Figure 7 : Représentation schématique du gène et de la structure des différentes formes de c-Kit chez l'Homme.....	15
Figure 8 : Représentation schématique des récepteurs à activité tyrosine kinase chez l'Homme (d'après Lemmon and Schlessinger, 2010).....	17
Figure 9 : Représentation schématique de l'activation de c-Kit par son ligand, le SCF (d'après Lennartsson and Rönnstrand, 2012)	21
Figure 10 : Représentations cristallographiques des structures secondaires du domaine extracellulaire de c-Kit sous forme active et inactive (Mol <i>et al.</i> , 2004)	22
Figure 11 : Structure du récepteur c-Kit et tyrosines phosphorylables	23
Figure 12 : Voie de signalisation PI3K/Akt en aval de l'activation du récepteur c-Kit par son ligand	24
Figure 13 : Voie de signalisation Jak/STAT en aval de l'activation du récepteur c-Kit par son ligand	26
Figure 14 : Voie de signalisation MAPK/Erk en aval de l'activation du récepteur c-Kit par son ligand	27
Figure 15 : Structure schématique et principe de régulation des SFK.....	29
Figure 16 : Schéma des processus de dégradation de c-Kit après activation par son ligand ..	31
Figure 17 : Expression différentielle du récepteur c-Kit à la membrane des cellules hématopoïétiques (d'après Lennartsson <i>et al.</i> 2005).....	33
Figure 18 : Représentation des membres de la famille des récepteurs à cytokine de classe I ...	38
Figure 19 : Schéma du récepteur de l'érythropoïétine et des voies de signalisation activée	40
Figure 20 : Représentation schématique du mécanisme d'activation du récepteur de l'érythropoïétine (R-EPO) par son ligand	42
Figure 21 : Dégradation du récepteur de l'érythropoïétine via le protéasome et le lysosome	44
Figure 22 : Biogenèse des ribosomes.....	47
Figure 23 : Maturation des ARNr	48
Figure 24 : Biogenèse des ribosomes et ribosomopathies associées	50
Figure 25 : Schéma de l'apoptose médiée par Fas/Fas-L des cellules érythroïdes.....	59

Figure 26 : Défaut de relocalisation d'Hsp70 dans les SMD et clivage de GATA-1.....	60
Figure 27 : Mutations activatrices de c-Kit fréquemment retrouvées en pathologie humaine	65
Figure 28 : Mode schématique d'action des inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK).....	70
Figure 29 : Structure chimique de l'imatinib et modélisation de son domaine de liaison au récepteur c-Kit.....	72
Figure 30 : Répartition des protéines nucléolaires selon leurs fonctions (d'après Couté <i>et al.</i> , 2006).....	96
Figure 31 : Structure nucléolaire.....	97
Figure 32 : Nucléoles en microscopie électronique (d'après Dousset <i>et al.</i> , 2000)	99
Figure 33 : Réorganisation des domaines structuraux du nucléole.....	107
Figure 34 : Suivi d'une culture de progéniteurs érythroïdes humains normaux.....	109
Figure 35 : Corrélation entre la taille des cellules et leur prolifération.....	111
Figure 36 : Etude en immunofluorescence de la protéine nucléolaire NPM1.....	113
Figure 37 : Evolution de la taille des CG selon la taille et la prolifération des érythroblastes	114
Figure 38 : Groupes d'échantillons en fonction de l'aspect cytologique de différenciation.....	117
Figure 39 : Analyse comparative du composé granulaire au cours de la différenciation normale et pathologique.....	119
Figure 40 : Microscopie électronique de cellules issues de patients et de cellules contrôle	120
Figure 41 : Persistance du composé granulaire au cours de la différenciation normale et pathologiques des SMD de faible risque.....	121
Figure 42 : Devenir du nucléole au cours de la différenciation érythroïde normale.....	123
Tableau 1: Classification des syndromes myélodysplasiques (SMD) selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) de 2008	55
Tableau 2 : Score IPSS-R des syndromes myélodysplasiques (SMD) (d'après Greenberg <i>et al.</i> , 2012).....	57
Tableau 3: Matériel biologique humain utilisé	116

ABREVIATIONS

AA	Acide Aminé
ABD	Anémie de Blackfan-Diamond
ADN	Acide Désoxyribo-Nucléique
AMPK	Adenosine monophosphate-activated protein kinase
APS	Adaptator Protein with SH2 domain
AREB	Anémie Réfractaire avec Excès de Blastés
ARN	Acide Ribo-Nucléique
ATP	Adénosine triphosphate
AVC	Accident Vasculaire Cérébral
BDNF	Brain Derived Neutrophic Factore
BFU	Burst Forming Unit
Bst	Belly spot and trial
β-Trcp	β-Transducer repeat-containing protein
CBF	Core Binding Protein
CF	Centre Fibrillaire
CFD	Composant Fibrillaire Dense
CFU	Colony Forming Unit
CG	Composé Granulaire
CRDM	Cytopénie Réfractaire à dysplasie multilignée
CRDU	Cytopénie Réfractaire à dysplasie unilignée
CSH	Cellule Souche Hématopoïétique
ECD	Extra-Cellular Domain
Emp	Erythroid macrophage protein
EPO	Erythropoïétine
Erk	Extracellular signal-regulated kinase
ETS	External Transcribed Spacer
Flt-3	FMS-like tyrosine kinase
Gab2	Grb2-associated binding protein 2
GDP	Guanosine diphosphate
GIST	Gastro-Intestinal Stromal Tumor
GMP	Granulocyte/Monocyte Factor
GPA	Glycophorine A
Grb2	Growth factor receptor-bound 2
GTP	Guanosine triphosphate
HDM2	Human Double Minute 2
HIF	Hypoxia Inducible Factor
HRE	Hypoxia Responsive Factor
Hsp	Heat shock protein
ICAM	Intracellular Cell Adhesion Molecule
Ig	Immunoglobuline
IPSS	International Pronostic Sroce System
ITK	Inhibitor Tyrosine Kinase

ITS	Internal Tanscribed Spacer
Jak	Janus kinase
JMD	Juxtamebrane Domain
KID	Kinase Insert Domain
LAM	Leucémie Aigüe Myéloïde
LMMC	Leucémie MyéloMonocytaire Chronique
LTC-IC	Long Term Culture Initiating Cell
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MCSF-R	Macrophage Colony Stimulator Factor-Receptor
MDM2	Mice Double Minute 2
MEP	Megakaryocyte/Erythroid Progenitor
MGG	May-Grünwald Giemsa
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
MITF	Microphthalmia-associated transcription factor
mTORC	mTOR Complex
NDF	Nucleolar Derived Foci
NFκB	Nuclear Factor-Kappa B
NK	Natural Killer
NOR	Nucleolar Organizer Region
NR	Neutropénie Réfractaire
OMS	Organisation Mondial de la Santé
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PDGF-R	Platelet Derived Growth Factor-Receptor
PH	Pleckstrin Homology
PI3K	Phosphatidyl-inositol-3-kinase
PIP₂	Phosphatidyl-inositol-4,5-diphosphate
PIP₃	Phosphatidyl-inositol-4,5-triphosphate
PNB	Pre-Nucleolar Bodies
PP2	Pyranozol-Pyrimidine 2
R-EPO	Récepteur de l'érythropoïétine
RNP	RinoNucléoProtéique
Rpl	Ribosomal Protein Large
Rps	Ribosomal Protein Small
RTK	Receptor Tyrosine Kinase
SBDS	Scwachman-Bodian-Diamond Syndrome
SCF	Stem Cell Factor
SCID	Severe Combined Immunofluorescent-Deficient
SCLC	Small Cell Lung Cancer
SDS	Syndrome de Swachman-Diamond
SEM	Standard Error of the Mean
SFK	Src Family Kinase
SH	Src Homology
SHP 1/2	SH Homology Protein 1/2
SILAC	Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture
SMD	Syndrome Myélodysplasique
SOCS	Suppressor Of Cytokine Signaling

SOS	Son Of Sevenless
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TKD	Tyrosine Kinase Domain
TMD	Transmembrane Domain
TPO	Thrombopoietine
UBF	Upstream Binding factor
UTR	UnTranslated Region
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Introduction

Erythropoïèse normale et pathologique

I. Généralités sur l'hématopoïèse

A. Définition

L'hématopoïèse est un processus continu permettant le renouvellement et le maintien de toutes les cellules sanguines (hématies, polynucléaires, plaquettes, monocytes et lymphocytes). Celles-ci sont issues d'une seule et même cellule multipotente appelée cellule souche hématopoïétique (CSH).

Sous l'influence de cytokines et facteurs de transcription, la CSH s'engage vers le compartiment myéloïde ou vers le compartiment lymphoïde, et devient un progéniteur commun, myéloïde ou lymphoïde. Ces progéniteurs, toujours sous le contrôle de signaux exogènes, vont s'engager vers différentes lignées hématopoïétiques, subir de nombreuses divisions et changements morphologiques, pour enfin donner naissance à des cellules matures, pouvant alors passer dans la circulation sanguine (**Figure 1**).

B. Les différentes étapes de l'hématopoïèse

1. Les cellules souches hématopoïétiques

Les cellules souches hématopoïétiques sont des cellules indifférenciées, majoritairement quiescentes, capables d'autorenouvellement ou de prolifération, et de différenciation en réponse à des signaux exogènes. Elles sont situées dans la moelle osseuse.

Morphologiquement non reconnaissables, ces cellules se définissent par leur capacité à reconstituer *in vivo* une hématopoïèse myéloïde et lymphoïde, lorsqu'elles sont injectées à des souris immunodéficientes NOD-SCID (Non Obese Diabetic-Severe Combined ImmunoDeficiency) irradiées. De plus, elles sont capables de former des colonies de type cobblestones lorsqu'elles sont cultivées pendant 5 à 10 semaines sur sous-couche stromale, appelées LTC-IC pour Long-Term Culture-Initiating Cell.

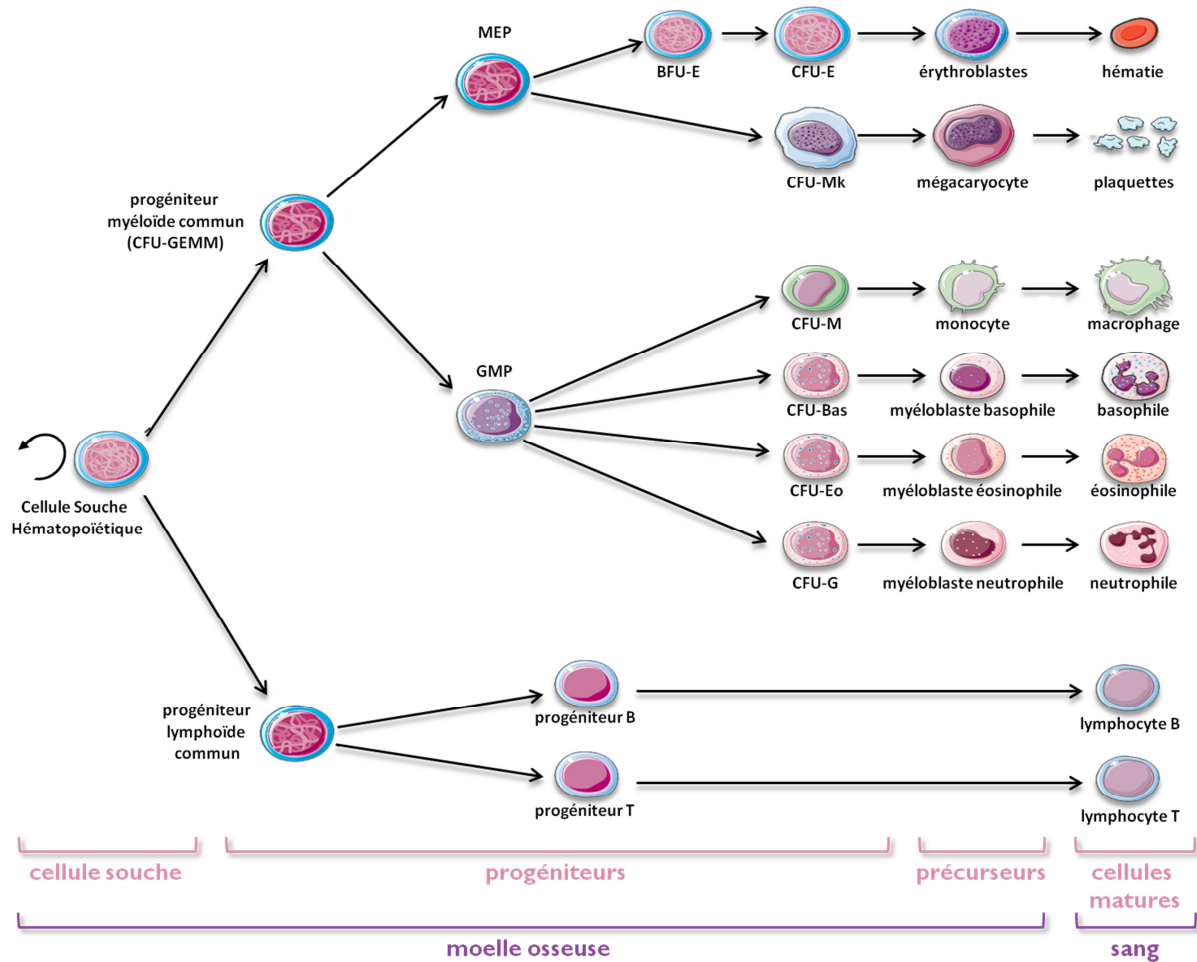


Figure 1 : Schéma de l'hématopoïèse

La cellule souche hématopoïétique (CSH) donne naissance à un progéniteur myéloïde ou lymphoïde. Le progéniteur lymphoïde devient progéniteur B ou progéniteur T, puis lymphocyte B ou lymphocyte T. Le progéniteur myéloïde se différencie en progéniteur MEP (Megakaryocyte/Erythroid Progenitor) ou en GMP (Granulocyte/Monocyte Progenitor), puis en progéniteur engagé vers une lignée spécifique. On retrouve les BFU-E (Burst Forming Unit-Erythroid) puis les CFU-E (Colony Forming Unit-Erythroid), CFU-Mk (Colony Forming Unit-Megakaryocyte), CFU-M (Colony Forming Unit-Macrophage), CFU-Baso (Colony Forming Unit-Basophil), CFU-Eo (Colony Forming Unit-Eosinophil), CFU-G (Colony Forming Unit-Granulocyte). Tous ces progéniteurs vont devenir précurseurs puis cellules matures. Les cellules matures quittent la moelle osseuse et passent dans la circulation sanguine.

2. Les progéniteurs

La première étape de la différenciation hématopoïétique est l'engagement de la CSH vers la lignée lymphoïde ou myéloïde. A ce stade, la cellule s'appelle progéniteur, et perd, au

fur et à mesure de la différenciation, sa capacité d'autorenouvellement. Le progéniteur lymphoïde commun donne naissance aux progéniteurs B et T qui deviendront par la suite des lymphocytes B et T. Le progéniteur myéloïde commun subit quant à lui, des étapes de différenciation supplémentaires. Dans un premier temps, il devient soit un progéniteur granulo-macrophagique (GMP) soit un progéniteur érythro-megacaryocytaire (MEP). Puis les GMP se différencieront en neutrophiles, éosinophiles, basophiles ou macrophages, alors que les MEP deviendront des globules rouges ou des plaquettes.

3. Les précurseurs

A ce stade, les précurseurs sont engagés de manière définitive vers une lignée particulière. Ces cellules sont morphologiquement reconnaissables.

4. Les cellules matures

Les cellules matures quittent la moelle osseuse pour aller dans la circulation sanguine, où elles pourront jouer leur rôle particulier.

II. L'érythropoïèse

A. Généralités sur l'érythropoïèse

L'érythropoïèse est une branche spécifique de l'arbre hématopoïétique. Elle permet la formation d'érythrocytes énucléés (réticulocytes puis globules rouges ou hématies) à partir de la CSH (**Figure 2**).

Les étapes de différenciation qui vont de la CSH à l'érythroblaste acidophile se déroulent dans la moelle osseuse. Une fois que l'érythroblaste a perdu son noyau, il passe dans la circulation sanguine, permettant ainsi l'apport d'oxygène à tous les organes.

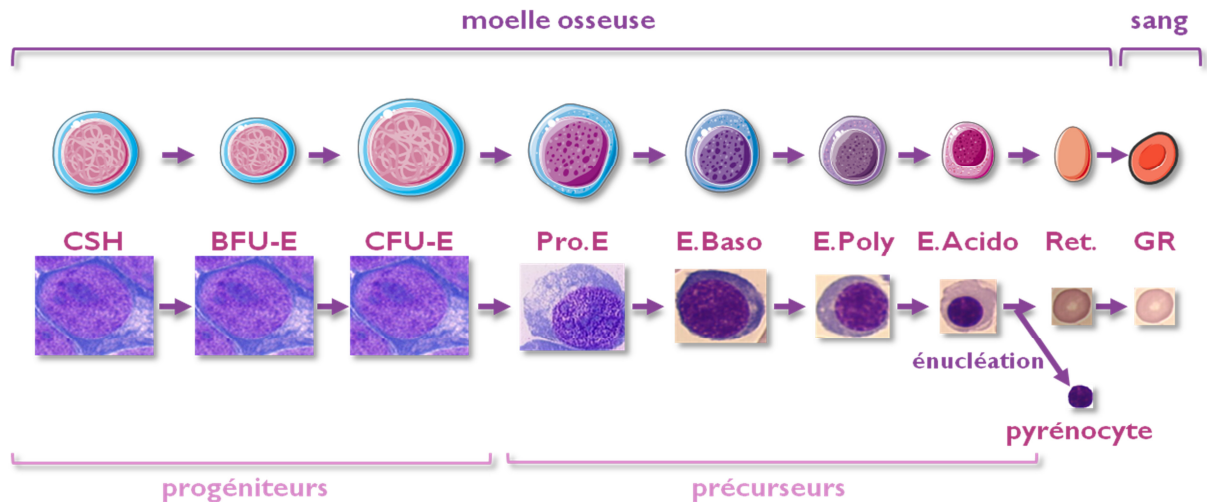


Figure 2 : Schéma de l'érythropoïèse

La production des globules rouges matures se fait à partir d'une cellule souche hématopoïétique (CSH). Après les stades BFU-E (Burst Forming Unit-Erythroid) et CFU-E (Colony Forming Unit-Erythroid), les cellules deviennent précurseurs et se différencient en proérythroblastes (ProE), Erythroblastes Basophiles (E. Baso), Erythroblastes Polychromatophiles (E. Poly), Erythroblastes Acidophiles (E.Acido), puis en Réticulocytes (Ret) et finalement en globules rouges (GR).

L'érythropoïèse est régulée par des facteurs environnementaux, des facteurs de croissance, hormones ou cytokines, permettant ainsi la survie, la prolifération et la différenciation des progéniteurs. L'expression différentielle de plusieurs facteurs de transcription tel que GATA-1 est également impliquée dans la maturation des érythroblastes.

B. La différenciation érythroïde

C'est au niveau de la moelle osseuse, au sein de l'îlot érythroblastique que se déroulent la maturation et la différenciation des érythroblastes.

1. Les progéniteurs érythroïdes

Les progéniteurs de type CFU-GEMM (pour Colony Forming Unit Granulocyte-Erythrocyte-Macrophage-Megakaryocyte), BFU-E (pour Burst Forming Unit-Erythroid) et

CFU-E (pour Colony Forming Unit Erythroid), ont une définition fonctionnelle basée sur leur capacité à donner des colonies en culture semi-solide (**Figure 3**).

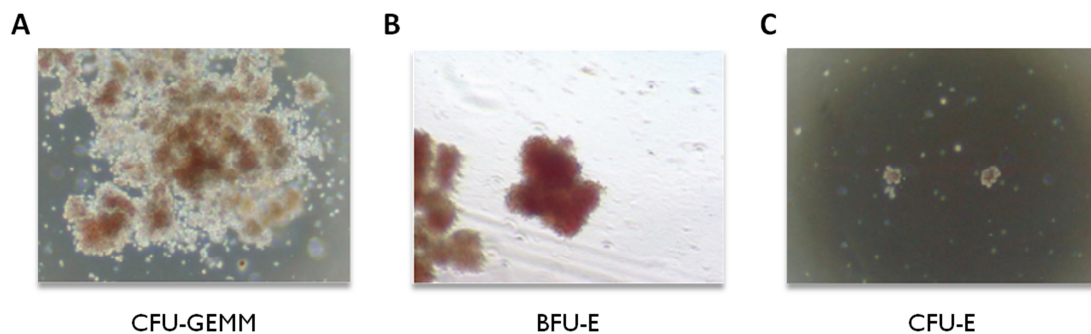


Figure 3 : Culture de progéniteurs hématopoïétiques en culture semi-solide

A. CFU-GEMM (pour Colony Forming Unit Granulocyte-Erythrocyte-Macrophage-Megakaryocyte) après 21 jours de culture. **B.** BFU-E (Burst Forming Unit-Erythroid) après 14 jours de culture. **C.** CFU-E (Colony Forming Unit Erythroid) après 7 jours de culture.

- **CFU-GEMM** : Dans la lignée érythroïde, le progéniteur multipotent le plus immature est la CFU-GEMM, également appelé progéniteur myéloïde. Il peut donner naissance à tous les progéniteurs engagés de la différenciation myéloïde. Après 21 jours de culture semi-solide, cette cellule est capable de former des colonies de grande taille comprenant des érythroblastes, des granulocytes, des macrophages, des mastocytes et des mégacaryocytes.

La CFU-GEMM ne représente que 0.01% des cellules médullaires.

- **BFU-E** : La BFU-E est le premier progéniteur totalement engagé dans la différenciation érythroïde. Cette cellule, dépendante du Stem Cell Factor (SCF), peut, en culture semi-solide, donner naissance en 14 jours à de grosses colonies. On distingue des BFU-E primitives (BFU-Ep) et des BFU-E tardives (BFU-Et), lesquelles sont dépendantes de l'érythropoïétine (EPO).

La BFU-E représente 0.3% des cellules médullaires.

- **CFU-E** : Enfin, la CFU-E est le progéniteur le plus mature de la lignée érythroïde. Cette cellule, dépendante de l'EPO, peut donner naissance en 7 jours à des globules rouges et à de petites colonies de moins de 50 cellules lorsqu'elle est cultivée en milieu semi-solide.

Tout comme le BFU-E, la CFU-E représente 0.3% des cellules médullaires.

En culture liquide ou sur frottis, les progéniteurs myéloïdes et érythroïdes sont morphologiquement identiques.

2. Les précurseurs érythroïdes

C'est à partir du stade pro-érythroblaste et jusqu'à l'érythroblaste acidophile que les cellules érythroïdes sont appelées « précurseurs ».

Au sein de l'îlot érythroblastique, les pro-érythroblastes vont donner naissance à des érythroblastes basophiles de type I, puis de type II. Ceux-ci vont se différencier en érythroblastes polychromatophiles puis en érythroblastes acidophiles. Ces derniers vont perdre leurs noyaux, et ainsi devenir réticulocytes. Une fois que le réticulocyte passe dans la circulation sanguine, il est appelé hématie ou globule rouge.

Au fur et à mesure de leur différenciation, les cellules diminuent de taille, leur chromatine se condense, le noyau devient pycnotique et est expulsé par bourgeonnement de la membrane plasmique.

L'étude morphologique de la différenciation par coloration au May-Grünwald Giemsa (MGG), permet de visualiser l'atténuation de la basophilie au profit de l'apparition d'une acidophilie cytoplasmique, liée à la production d'hémoglobine dans le cytoplasme.

La transition entre érythroblastes basophiles et polychromatophiles dépend d'une activation contrôlée des caspases dont le mécanisme n'est à ce jour pas encore connu (Zermati *et al.*, 2001).

3. Les réticulocytes et les globules rouges

Dans la moelle osseuse, les réticulocytes sont énucléés.

Dans le sang, les globules rouges, ou hématies, assurent le transport de l'oxygène, lié à l'hémoglobine, depuis les poumons jusqu'aux organes (l'hémoglobine représente 30% des protéines du globule rouge).

Chez les mammifères, l'énucléation est une étape indispensable à la maturation des réticulocytes. Ce processus dynamique est sous le contrôle de la GTPase RAC et consiste en la polarisation de la cellule *via* la réorganisation des filaments d'actine (Konstantinidis *et al.*, 2012).

Au cours de l'énucléation, la membrane plasmique entoure le noyau et forme des extensions qui le reliait à la cellule érythroïde. Une fois indépendant, le pyrénocyte (noyau nu après énucléation) est encore enveloppé de morceau de membrane, et c'est celle-ci qui, en exprimant des phosphatidyl sérines, donne le signal de phagocytose au macrophage central de l'îlot érythroblastique (Yoshida *et al.*, 2005) (**Figure 4**).

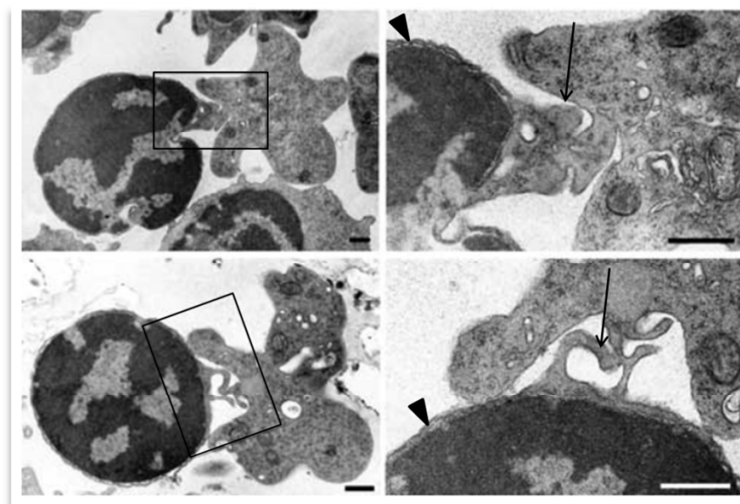


Figure 4 : Énucléation en microscopie électronique (Yoshida *et al.*, 2005)

→ extensions de la membrane plasmique ► membrane plasmique entourant le pyrénocyte.

Une fois que la différenciation érythroïde a permis la formation d'un réticulocyte, ce dernier va encore subir quelques modifications avant de passer dans la circulation sanguine.

Dans un premier temps, il va perdre tous ces organelles, dont ses mitochondries et ses ribosomes. En 2007, Diwan *et al.* observe une augmentation de l'expression de la protéine NIX (membre de la famille des protéines Bcl-2) dans des érythroblastes en phases

tardives de la différenciation, et note une réticulocytose, due à un défaut de maturation des réticulocytes, chez les souris déficientes pour le gène codant cette protéine (Diwan *et al.*, 2007). En conditions physiologiques, les réticulocytes éliminent leurs mitochondries par autophagie et exocytose. Lorsque NIX n'est plus exprimée, les autophagosomes n'achèvent pas leur maturation et les mitochondries persistent, ne pouvant donc plus être éliminées par ces autophagosomes non fonctionnels (Schweers *et al.*, 2007).

Il apparaît également que la sérine/thréonine kinase Ulk-1, acteur clé de l'autophagie, et sous le contrôle du complexe mTORC1 et de l'APMk (Alers *et al.*, 2012) (Kundu, 2011), soit impliquée dans l'élimination des mitochondries et des ribosomes du réticulocyte. En effet, Kundu *et al.* a montré que les souris déficientes pour le gène codant Ulk-1 présentent, tout comme les souris n'exprimant plus NIX, une réticulocytose et que 35% des globules rouges de ces souris conservent leurs mitochondries et leurs ribosomes (Kundu *et al.*, 2008).

Après cette étape, le réticulocyte va perdre sa forme irrégulière et sa rigidité, pour prendre une forme discoïde biconcave, devenir plus souple et diminuer de taille, afin de mieux se faufiler dans les vaisseaux sanguins et les capillaires les plus fins. Ces changements morphologiques sont dus à un réarrangement du cytosquelette associé à la membrane plasmique, ainsi qu'à l'expression différentielle de protéines membranaires (Waugh *et al.*, 2001).

Environ $2 \cdot 10^{11}$ globules rouges sont produits par jour, et ces derniers ont une durée de vie d'environ 120 jours. Lorsqu'un globule rouge n'est pas fonctionnel, il est éliminé par la rate.

4. L'ilot érythroblastique

Uniformément distribués dans le moelle osseuse, les ilots érythroblastiques, composés d'un macrophage central, autour duquel sont organisés les cellules érythroïdes à tous les stades de différenciation, soutiennent la maturation des érythroblastes (Mohandas and Prenant, 1978) (Figure 5).

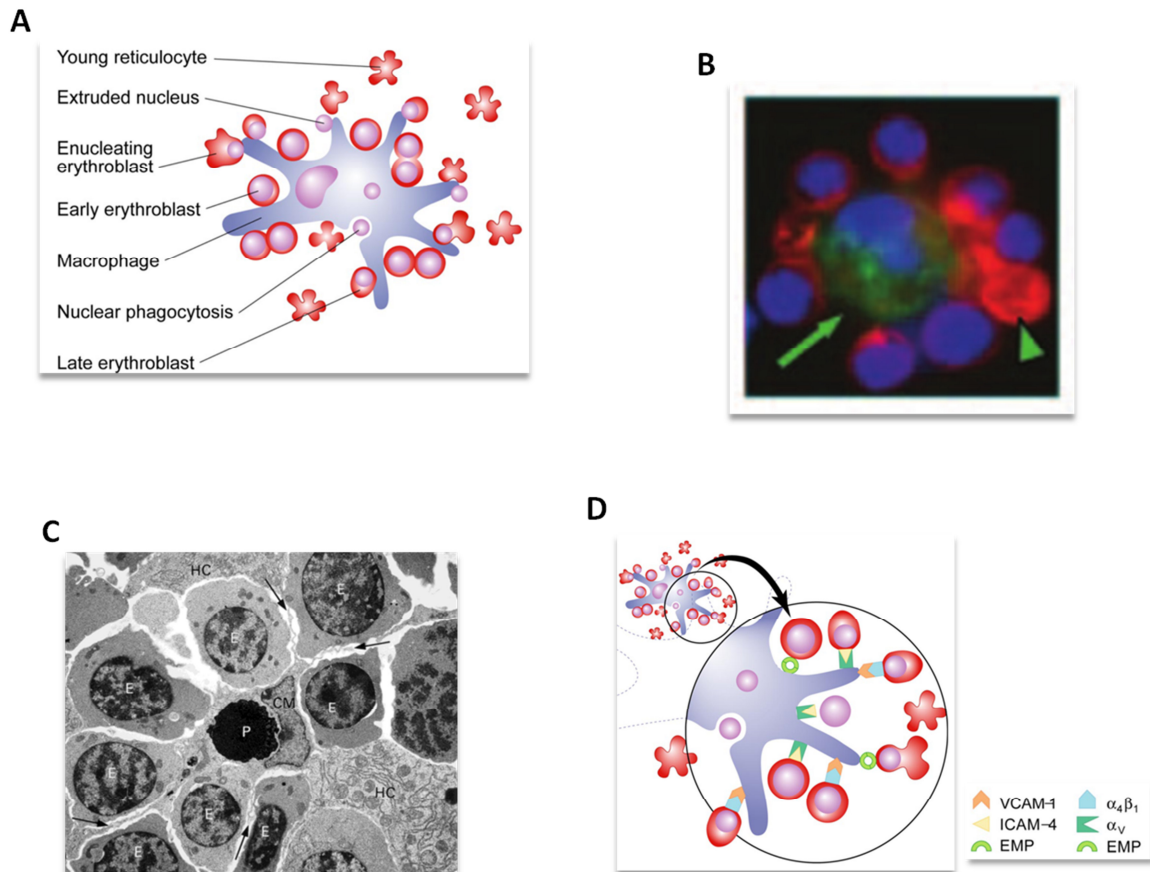


Figure 5 : L'îlot érythroblastique

L'îlot érythroblastique est composé d'un macrophage central entouré par des érythroblastes à tous stades de différenciation. **A.** Représentation schématique de l'îlot érythroblastique (Chasis and Mohandas, 2008). **B.** Ilot érythroblastique murin en microscopie photonique ; rouge : Ter119 (marquage spécifique des érythroblastes) ; vert : M-CSF-GFP (marqueur du macrophage) ; bleu : Hoechst (noyau) (Lee *et al.*, 2006). **C.** Ilot érythroblastique murin en microscopie électronique ; CM : macrophage central ; P : phagosome ; → : extensions cytoplasmique du macrophage ; E : érythroblastes ; HC : hépatocyte ; X5000. **D.** Représentation schématique des interactions macrophage/érythroblastes (Chasis and Mohandas, 2008).

Cette organisation permet l'interaction des cellules érythroïdes avec le macrophage central.

La première molécule permettant l'adhésion entre le macrophage central et les érythroblastes a été découverte en 1994. Cette protéine appelée Emp (Erythro macrophage protein) est exprimée à la surface des érythroblastes et du macrophage (Hanspal and Hanspal, 1994). En 1998, Hanspal *et al.* montre que cette protéine est essentielle à la maturation des érythroblastes. En effet, les cellules primaires co-cultivées en présence

d'anticorps bloquant dirigés contre Emp, ou en absence de macrophage, présentent un taux 6 fois plus élevé d'apoptose ainsi qu'une diminution drastique de la prolifération, de la maturation et de l'énucléation des cellules érythroïdes, par rapport aux cellules primaires cultivées avec des macrophages, et sans anticorps bloquant (Hanspal *et al.*, 1998). De plus, les souris déficientes pour le gène codant la protéine Emp présentent une anémie sévère ainsi qu'un défaut d'énucléation (Soni *et al.*, 2006).

Le couple formé par l'intégrine VLA-4, exprimée par les érythroblastes, et la protéine d'adhésion VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1), exprimée par le macrophage, est également impliqué dans la stabilité de l'îlot érythroblastique. L'ajout d'anticorps bloquants dirigés contre VLA-4 ou VCAM-1, induit sa dislocation (Sadahira *et al.*, 1995).

Les travaux de Lee *et al.*, montrent que les souris déficientes pour le gène codant la molécule d'adhésion ICAM-1 (Intracellular Cell Adhesion Molecule-1), exprimée par les érythroblastes, ont moins d'îlots érythroblastiques que des souris contrôles. Les auteurs impliquent également la sous-unité $\alpha 5$ des intégrines, exprimée par le macrophage, dans ce phénotype, car l'inhibition de la liaison entre ICAM-1 et l' $\alpha 5$ diminue de 2 fois le nombre d'îlots érythroblastiques obtenus dans la condition contrôle (Lee *et al.*, 2006).

C'est au niveau de l'îlot érythroblastique que siège le principal mécanisme de régulation négative de l'érythropoïèse qui implique le récepteur à domaine de mort Fas et son ligand, Fas-L. En condition normale, les progéniteurs érythroblastiques et les précurseurs immatures expriment le récepteur de mort Fas, alors que les érythroblastes plus matures (les érythroblastes polychromatophiles et acidophiles) expriment son ligand, Fas-L (De Maria *et al.*, 1999). La cohabitation, au sein de l'îlot érythroblastique, de cellules à différents stades de maturation, permet de réguler la production d'érythroblastes *via* l'activation du récepteur Fas par son ligand et l'induction de l'apoptose des cellules immatures en excès.

Cette cohabitation affecte la maturation et/ou la différenciation des érythroblastes, mais le macrophage central a d'autres fonctions telles que le stockage du fer et la phagocytose des érythroblastes apoptotiques ainsi que des pyrénocytes.

III. Cytokines régulatrices de l'érythropoïèse

A. Le couple SCF/c-Kit

1. Le Stem Cell Factor (SCF)

Le SCF (Stem Cell Factor), également appelé KIT-LG (KIT Ligand) ou MGF (Mast cell Growth Factor) a été caractérisé et cloné au début des années 1990 (Huang *et al.*, 1990; Williams *et al.*, 1990) (Zsebo *et al.*, 1990) (Anderson *et al.*, 1991).

Le SCF est une cytokine produite de façon ubiquitaire, principalement synthétisée par les cellules stromales, les fibroblastes, les cellules endothéliales et les cellules de Sertoli et de la granulosa.

a) *Le gène du SCF*

Chez la souris, le SCF est codé par un gène situé au niveau du locus *Steel* sur le chromosome 10 (Zsebo *et al.*, 1990). Chez l'Homme, ce gène est localisé en position q22-q24 sur le chromosome 12 (Geissler *et al.*, 1991), et est organisé en 8 exons, qui pourront donner naissance à deux isoformes suite à l'épissage alternatif de l'exon 6.

Les souris déficientes pour ce gène présentent une anémie sévère et meurent *in utéro* ou dans la période périnatale d'une anémie macrocytaire sévère, alors que les souris invalidées de manière hétérozygote sont viables, malgré une anémie macrocytaire, des altérations de la fertilité et une dépigmentation cutanée.

Ces observations ont rapidement impliqué l'axe SCF/c-Kit dans l'hématopoïèse ainsi que dans d'autres processus physiologiques comme la spermatogenèse ou la mélonagenèse.

b) La protéine

Chez l'Homme, le SCF existe sous deux isoformes majoritaires : une isoforme soluble, le sSCF, de 165 acides aminés, et une isoforme transmembranaire, le mSCF, de 220 acides aminés. Le mSCF présente en sa partie C-terminale un domaine d'ancrage à la membrane. Le sSCF, issue d'un précurseur de 245 acides aminés, contient un site de clivage protéolytique codé par l'exon 6, qui provoque la perte du domaine transmembranaire (Brannan *et al.*, 1991) (Flanagan *et al.*, 1991) (Figure 6).

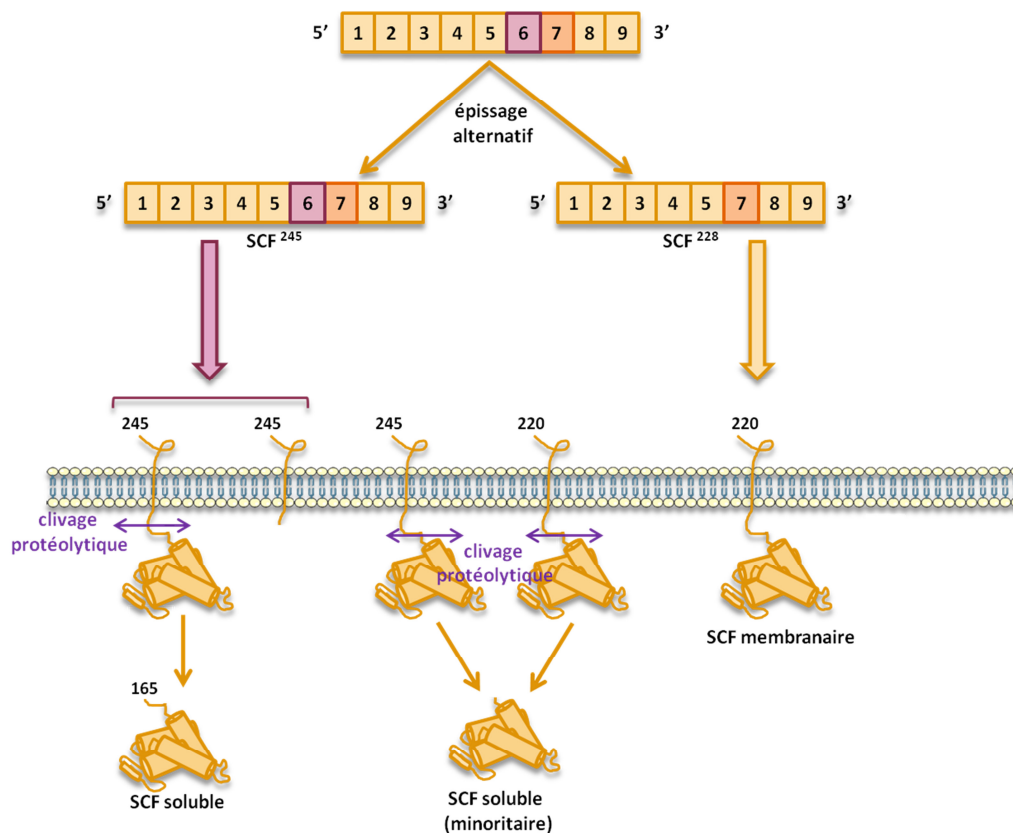


Figure 6 : Du gène à la protéine, schéma des voies de synthèse du SCF (d'après Reber *et al.*, 2006)

Chez l'Homme, l'épissage alternatif au niveau de l'exon 6 de l'ARN messager de c-Kit génère deux isoformes membranaires, le SCF²⁴⁵ et le SCF²²⁰. Le SCF²⁴⁵ est clivé au niveau de la région codée par l'exon 6, et donne naissance au SCF soluble. Chez la souris le SCF²⁴⁵ et le SCF²²⁰ membranaires peuvent être clivés au niveau de la région codée par l'exon 7, et donner naissance à une forme soluble minoritaire.

En 1994, Majumdar *et al.* a mis en évidence, dans un modèle murin, un deuxième site de clivage protéolytique présent au niveau de l'exon 7 et pouvant donner naissance à une nouvelle isoforme soluble minoritaire. Celle-ci est issue du clivage de la forme soluble ou membranaire du SCF (Majumdar *et al.*, 1994). Cependant, les conséquences fonctionnelles de cette isoforme sont, à ce jour, encore inexplorées.

Des études comparatives menées sur les deux isoformes majoritaires du SCF, le mSCF et le sSCF, semblent montrer que dans un contexte de contact cellulaire, comme par exemple la différenciation érythroïde et mégacaryocytaire, la signalisation en aval de c-Kit est initiée par le mSCF (Avraham *et al.*, 1992) (Toksoz *et al.*, 1992). Néanmoins, la forme soluble du SCF peut également participer à cette signalisation de « contact ». En effet, les souris n'exprimant plus que le sSCF sont viables, malgré l'anémie macrocytaire qu'elles présentent (Barker, 1994). En revanche, il semble que la forme mSCF induise une activation plus longue et plus intense du récepteur c-Kit (Miyazawa *et al.*, 1995) (Kapur *et al.*, 1998), et que, parmi les voies de signalisation induites, la voie p38/MAPK lui soit plus spécifique (Kapur *et al.*, 2002) (Trieselmann *et al.*, 2003).

2. c-Kit, le récepteur du SCF

En 1986, Besmer *et al.* a mis en évidence l'existence de l'oncogène v-Kit, *via* la souche HZ4-FeSV (Hardy Zuckerman 4 Feline Sarcoma Virus), isolée à partir d'un rétrovirus issu de fibroblastes de chat et associée au FeLV (Feline Leukemia Virus). Cet oncogène présente un domaine kinase unique, lié au gène *gag*, codant pour l'enveloppe virale (Besmer *et al.*, 1986). C'est en 1987 que son homologue cellulaire c-Kit est cloné (Yarden *et al.*, 1987).

a) Le gène de c-Kit

Chez la souris, le gène codant pour c-Kit est localisé au niveau du locus *White* (W) présent sur le chromosome 5 (Chabot *et al.*, 1988). La majorité des souris totalement invalidées pour ce gène n'est pas viable et meurt *in utero*, ou durant la période périnatale, d'une anémie macrocytaire sévère (Geissler *et al.*, 1988) (Waskow *et al.*, 2002) (Waskow *et al.*, 2004). Les souris invalidées pour une copie du gène ou présentant des mutations

hypomorphes arborent des phénotypes modestes, principalement caractérisés par des zones de dépigmentation cutanée.

Chez l'Homme, le gène codant pour c-Kit est localisé en position q12 sur le chromosome 4 (Giebel *et al.*, 1992). Il s'étend sur 80 kb et est organisé en 21 exons.

L'exon 1 contient l'extrémité 5' non codante, le codon d'initiation de la traduction et le peptide signal d'adressage à la membrane plasmique. Les exons 2 à 9 codent pour les 5 domaines de type immunoglobuline (aussi appelés domaines Ig-like) de la partie extra-cellulaire du récepteur. L'exon 10 code pour sa partie transmembranaire et l'exon 11 pour sa partie juxtamembranaire. Le domaine intracellulaire portant l'activité kinase du récepteur est divisé en trois parties. La première partie, dédiée à la fixation de l'ATP, est codée par les exons 12 à 14, alors que le domaine catalytique est codé par les exons 16 à 19. Ces deux domaines sont séparés par une région « insert » ou KID, codé par l'exon 15. Enfin, les exons 20 et 21 codent la partie C-terminale du récepteur, ainsi que le codon stop, l'extrémité 3' non codante et le site de poly-adénylation (**Figure 7**).

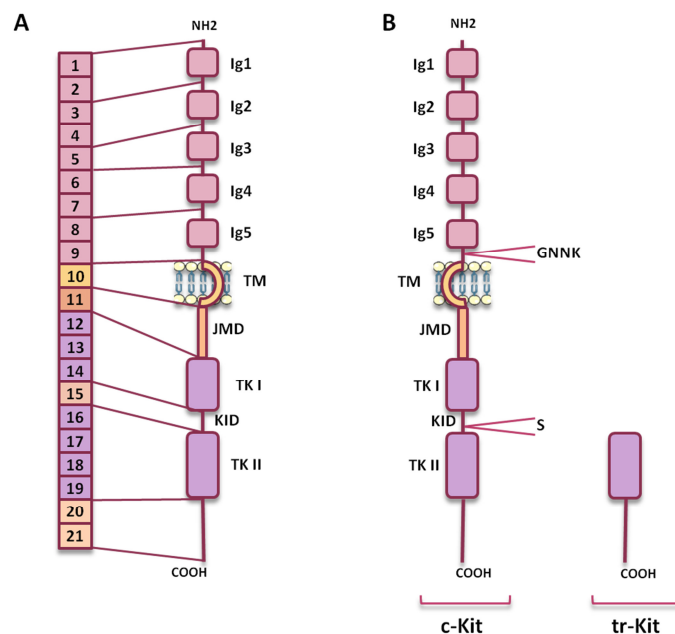


Figure 7 : Représentation schématique du gène et de la structure des différentes formes de c-Kit chez l'Homme

A. Structure du gène codant pour c-Kit (à gauche), et domaines protéiques associés à chaque exon (à droite). **B.** Structure protéique des différents variants issus d'épissages alternatifs.

La récepteur c-Kit appartient à la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) de classe III, dont font également partie le PDGF-R (Platelet-Derived Growth Factor – Receptor), le MCSF-R (Macrophage Colony Stimulator Factor-Receptor) et Flt3 (FMS-like tyrosine kinase 3) (**Figure 8**).

b) Récepteurs à activité tyrosine kinase, généralités

Les RTK sont des glycoprotéines transmembranaires possédant classiquement trois domaines structuraux :

- un domaine extracellulaire fortement glycosylé et dédié à la liaison du ligand. Ce domaine variable d'un membre à l'autre de la famille, présente néanmoins des régions conservées, tels que les domaines riches en cystéine ou en leucine.
- un domaine transmembranaire hydrophobe, qui permet l'ancrage du récepteur à la membrane plasmique.
- un domaine intracellulaire portant l'activité kinase et permettant la transduction du signal. Celui-ci peut être divisé en deux régions alors séparées par un domaine insert, le KID (Kinase Domain Insert).

On compte aujourd'hui vingt classes de RTK (**Figure 8**), dont les membres sont des protéines codées par 58 gènes (pour revue, Lemmon and Schlessinger, 2010).

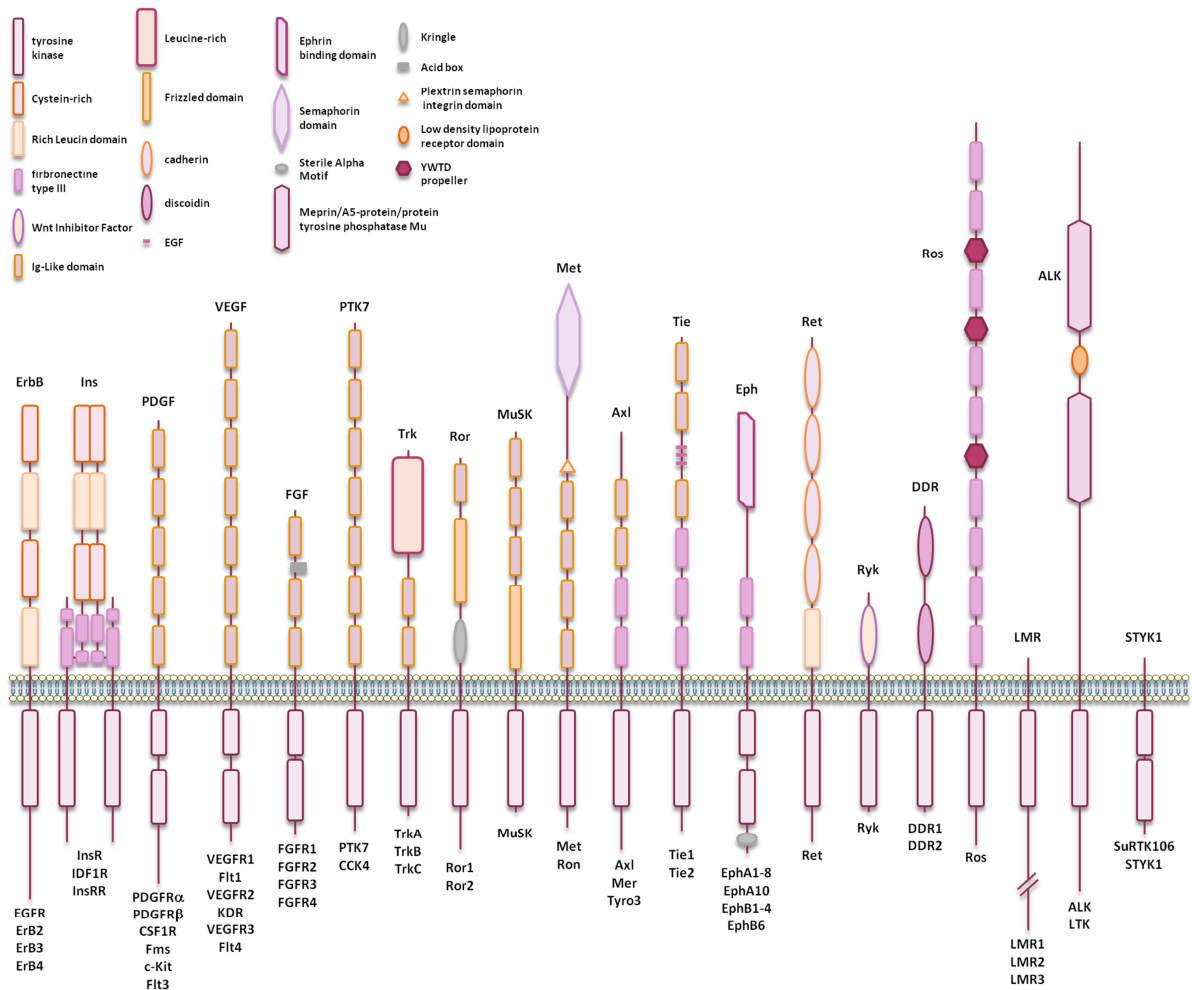


Figure 8 : Représentation schématique des récepteurs à activité tyrosine kinase chez l'Homme (d'après Lemmon and Schlessinger, 2010)

La famille des récepteurs à activité tyrosine kinase regroupe 20 sous-familles. Ses membres présentent un domaine extracellulaire dédié à la liaison du ligand, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire permettant la transduction du signal.

c) La protéine

La protéine c-Kit est un récepteur transmembranaire de 976 acides aminés. Sans modification post-traductionnelle, c-Kit a une masse moléculaire apparente de 110kDa. Sous forme mature, obtenue après 10 N-glycosylations, c-Kit a une masse moléculaire de 125kDa puis de 145kDa.

c-Kit est divisé en quatre domaines :

- un domaine extracellulaire (**ECD**) (AA 1 à 519)
- un domaine transmembranaire (**IMD**) (AA 520 à 543)
- un domaine juxtamembranaire (**JMD**) (AA 544 à 581)
- un domaine intracellulaire portant l'activité catalytique (**TKD**) (AA 582 à 976)

- **l'ECD** : la région extracellulaire de c-Kit comprend 5 domaines Ig-like.

Au cours des années 2000, des études cristallographiques ont permis de mettre en évidence les rôles spécifiques de chacun de ces domaines. Les trois premiers, situés en N-terminal, sont dédiés à la reconnaissance et à la fixation de son ligand, le SCF, alors que les deux derniers domaines sont impliqués dans le processus d'hétérodimérisation de c-Kit (Zhang *et al.*, 2000) (Yuzawa *et al.*, 2007). Cependant, des études biochimiques utilisant des mutants de c-Kit avaient déjà mis en évidence les rôles de ces domaines. En effet, en 1995, Blechman *et al.* construit des mutants de c-Kit avec délétion d'un ou plusieurs domaines Ig-like et montre que l'absence des deux derniers domaines n'inhibe pas la fixation du SCF, mais bloque la dimérisation de c-Kit (Blechman *et al.*, 1995).

En 1995, l'équipe de V. Broudy, montre, dans un modèle de mastocytes murins, que c-Kit peut également exister sous forme soluble (c-KitS) (Turner *et al.*, 1995). Ce variant de c-Kit n'est pas issu d'un épissage alternatif, mais résulte d'un clivage protéolytique intervenant entre le domaine transmembranaire et l'Ig-like 5 (Broudy *et al.*, 2001).

Ce domaine extracellulaire contient également 10 sites potentiels de N-glycosylation, principalement localisés à proximité du domaine transmembranaire. Ces modifications post-traductionnelles, permettant au récepteur d'aboutir sa maturation, n'ont cependant que très peu été étudiées.

- **le TMD** : ce domaine, comprenant 23 acides aminés, est constitué d'une hélice hydrophobe qui permet l'ancrage du récepteur à la membrane plasmique.

- **le JMD** : ce domaine contient plusieurs résidus tyrosine servant de point d'ancrage à certains acteurs de la signalisation en aval de c-Kit. Il joue également un rôle de régulateur négatif. En effet, en condition inactive, ce domaine interagit avec le

domaine kinase, bloquant alors l'accès à la poche catalytique (Hubbard, 2004) (Lemmon and Schlessinger, 2010).

- **le TKD** : ce domaine est caractéristique des protéines à activité tyrosine kinase et porte l'activité kinase du récepteur. Il est divisé en deux régions séparées par un domaine insert de 77 acides aminés (KID). Ce domaine contient des résidus tyrosine phosphorylables en réponse au SCF.

Le domaine le plus proche de la membrane plasmique, appelé lobe N, présente un motif riche en glycine, de séquence GAGAFG, permettant la fixation de l'ATP, ainsi qu'une hélice α contrôle (α C-helix) qui passe d'une conformation inactive à une conformation active en réponse à la fixation du SCF (Mol *et al.*, 2003a).

Le deuxième domaine kinase du TKD est appelé lobe C. Il supporte l'activité phosphotransférase du récepteur et contient l'Asparagine 810 qui coordonne les groupements phosphate de l'ATP (Roskoski, 2005).

d) Les variants alternatifs de c-Kit

Il existe quatre isoformes de c-Kit chez l'Homme dont deux sont conservées chez la souris.

En position 510-513, au niveau du domaine extracellulaire adjacent à la membrane, une insertion de 4 acides aminés (Gly-Asn-Asn-Lys) donne naissance à un variant de c-Kit, appelé c-KitA. Ces deux isoformes, GNNK+ (c-KitA) et GNNK- (c-Kit), présentes chez l'Homme et la souris, résultent d'un épissage alternatif (Hayashi *et al.*, 1991) (Reith *et al.*, 1991). Dans la majorité des tissus, ces deux isoformes sont exprimées, mais il apparaît que l'isoforme GNNK- soit plus synthétisée que l'isoforme GNNK+ (Reith *et al.*, 1991) (Crosier *et al.*, 1993) (Zhu *et al.*, 1994). Aucune modification de signalisation en aval de ces deux isoformes n'a été montrée, même s'il semble que l'isoforme GNNK- présente une cinétique d'activation et une auto-phosphorylation basale plus élevée.

L'implication de ces variants dans les cancers reste encore sujette à débat. Par exemple, en 2007, Guerrini *et al.* corrèle un mauvais pronostic chez les patients atteints de Leucémies Aigües Myéloïdes (LAM) avec la co-expression de ces deux isoformes (Guerrini *et*

al., 2007), alors que Piao *et al.* ne relie pas l'expression de l'une ou l'autre des isoformes avec une réponse thérapeutique ou avec un impact pronostic (Piao *et al.*, 1994).

Chez l'Homme uniquement, un deuxième site d'épissage alternatif génère, *via* la délétion de 3 paires de base, deux autres isoformes. Celles-ci diffèrent du fait de la présence ou l'absence d'une sérine en position 715, au niveau du domaine KID (Lasota *et al.*, 2002). Ces deux isoformes semblent être co-exprimées dans les cellules normales et les cellules issues de patients porteurs de LAM, même si celles-ci surexpriment légèrement l'isoforme avec sérine (Crosier *et al.*, 1993).

Enfin, il existe une forme tronquée de c-Kit ne possédant que la deuxième partie du domaine kinase et la partie C-terminale du récepteur (Rossi *et al.*, 1992). Ce variant ne possède pas d'activité kinase, mais semble capable, dans un contexte de cancer de la prostate, d'activer des membres de la famille des Src kinase (Paronetto *et al.*, 2004).

3. Activation du récepteur par son ligand

a) *Fixation du ligand et homodimérisation du récepteur*

Le SCF circulant est monomérique. Son homodimérisation, reposant sur des liaisons non covalentes entre deux molécules de SCF, est essentielle à son activité (Zhang *et al.*, 2000) ainsi qu'à sa fixation au récepteur c-Kit. En 1997, Lemmon *et al.* démontre que la liaison d'un homodimère de SCF induit l'homodimérisation du récepteur (Lemmon *et al.*, 1997). Le SCF dimérique s'associe à deux récepteurs c-Kit *via* leurs trois premiers domaines Ig-like (Ullrich and Schlessinger, 1990). Cette liaison va induire un rapprochement des deux récepteurs et les Ig-like 4 et 5 vont permettre la formation d'un complexe c-Kit/c-Kit, *via* des liaisons homotypiques non covalentes (Yuzawa *et al.*, 2007). Par la suite, c-Kit va subir des changements conformationnels permettant le rapprochement des domaines juxtamembranaires et transmembranaires des deux récepteurs impliqués, et initie ainsi le passage d'une conformation inactive à une conformation active (Finger *et al.*, 2009) (**Figure 9**).

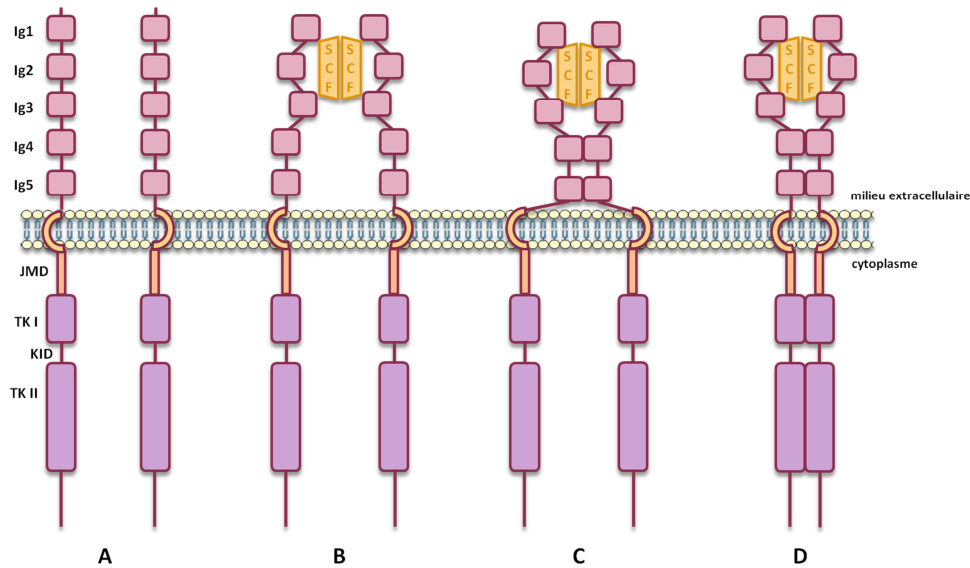


Figure 9 : Représentation schématique de l'activation de c-Kit par son ligand, le SCF (d'après Lennartsson and Rönnstrand, 2012)

A. Au repos, c-Kit est sous forme de monomère. **B.** Liaison d'un dimère de SCF à deux monomères de c-Kit, au niveau de leurs trois premiers domaines Ig-Like. **C.** Changement conformationnel du récepteur. **D.** Homodimérisation de c-Kit.

b) Activation et autophosphorylation du récepteur

En conformation inactive, le JMD de c-Kit interagit avec son domaine kinase, bloquant ainsi l'accès à la poche catalytique (Chan *et al.*, 2003).

En réponse au SCF, les tyrosines 568 et 570, présentes au niveau du domaine juxtamembranaire de c-Kit, sont phosphorylées (DiNitto *et al.*, 2010) et provoquent le déplacement du JMD, aboutissant à l'ouverture de la poche catalytique (Mol *et al.*, 2003a). A ce stade, les deux récepteurs se font face, l'un devenant le substrat de l'autre, qui joue alors le rôle de l'enzyme, permettant ainsi leur transphosphorylation (**Figure 10**).

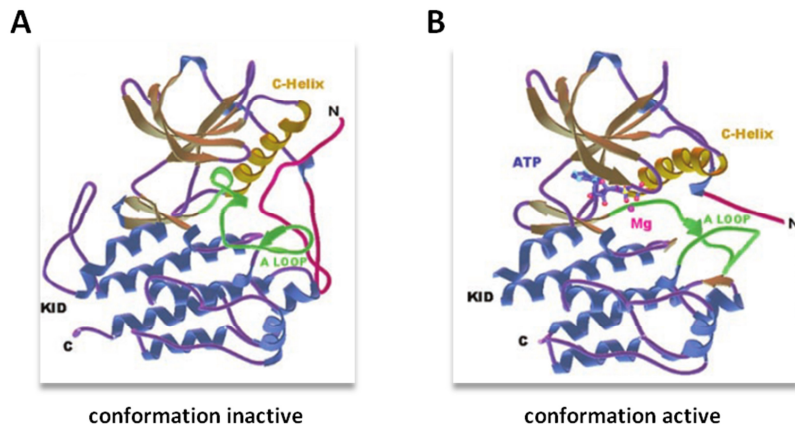


Figure 10 : Représentations cristallographiques des structures secondaires du domaine extracellulaire de c-Kit sous forme active et inactive (Mol et al., 2004)

A. Représentation de la forme inactive (auto-inhibée) de c-Kit. La région juxtamembranaire (pourpre) se loge au niveau des deux domaines kinases, bloquant ainsi l'accès à la poche catalytique. **B.** Représentation de la forme active de c-Kit, après stimulation au SCF. La région juxtamembranaire se dégage du domaine kinase, libérant ainsi l'accès à la poche catalytique. En présence de Mg^{2+} (rose), l'ATP peut alors s'y fixer.

c-Kit présente huit résidus tyrosines phosphorylables, tous situés dans le domaine intracellulaire, et dont la séquence d'activation par phosphorylation est à ce jour bien déterminée (Lennartsson *et al.*, 2005) (**Figure 11**).

Une fois phosphorylées, ces tyrosines permettent le recrutement de protéines à domaine SH2 (Src Homology 2) initiant ainsi différentes voies de signalisations. Parmi ces tyrosines, seul le rôle de la Y823, située sur le lobe actif de c-Kit, n'est pas encore clairement élucidé. En effet, aucun partenaire moléculaire n'y a été associé et elle apparaît comme participant à la stabilisation de la conformation active de c-Kit. Pourtant, sa substitution en phénylalanine n'empêche pas l'activation du récepteur (DiNitto *et al.*, 2010)

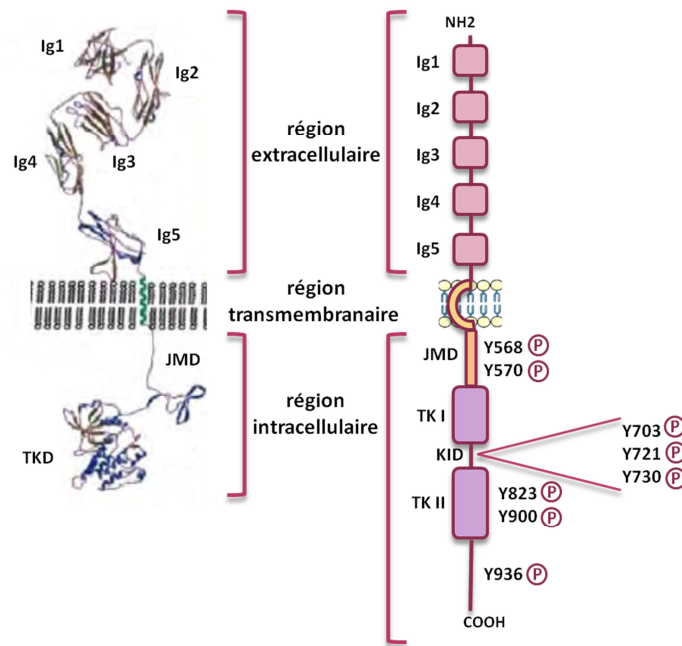


Figure 11 : Structure du récepteur c-Kit et tyrosines phosphorylables

Association de la structure secondaire du récepteur et de sa représentation schématisée, ainsi que la localisation des résidus tyrosines phosphorylés ; JMD : domaine juxta-membranaire ; TKD : domaine tyrosine kinase ; KID : domaine insert.

4. c-Kit et signalisation cellulaire

Selon le modèle cellulaire et les conditions pathologiques, l'activation de c-Kit par son ligand le SCF, résulte en l'initiation de différentes cascades de signalisation, dont les principales sont détaillées ci-après.

a) *La voie PI3K/AKT*

La signalisation PI3K/Akt en aval de c-Kit débute par la fixation de p85, sous-unité catalytique de la phosphatidyl-inositol-3-kinase (PI3K), à la tyrosine phosphorylée 721 de c-Kit. Cette liaison se fait de façon directe ou indirecte, par l'intermédiaire de la protéine adaptatrice Gab2 (GRB2-associated-binding protein 2) (Roskoski, 2005).

Une fois active, la PI3K permet la phosphorylation de PIP₂ (Phosphatidyl-inositol-4,5-diphosphate), qui devient alors du PIP₃ (Phosphatidyl-inositol-4,5-triphosphate). Cette

dernière interagit alors avec la sérine/thréonine kinase Akt/PBK (Protein Kinase B), *via* son domaine PH (Pleckstrin Homology), assurant ainsi la phosphorylation de sa thréonine 308, par le recrutement de la kinase PDK1 (Phosphoinositide Dependent Kinase 1) (**Figure 12**).

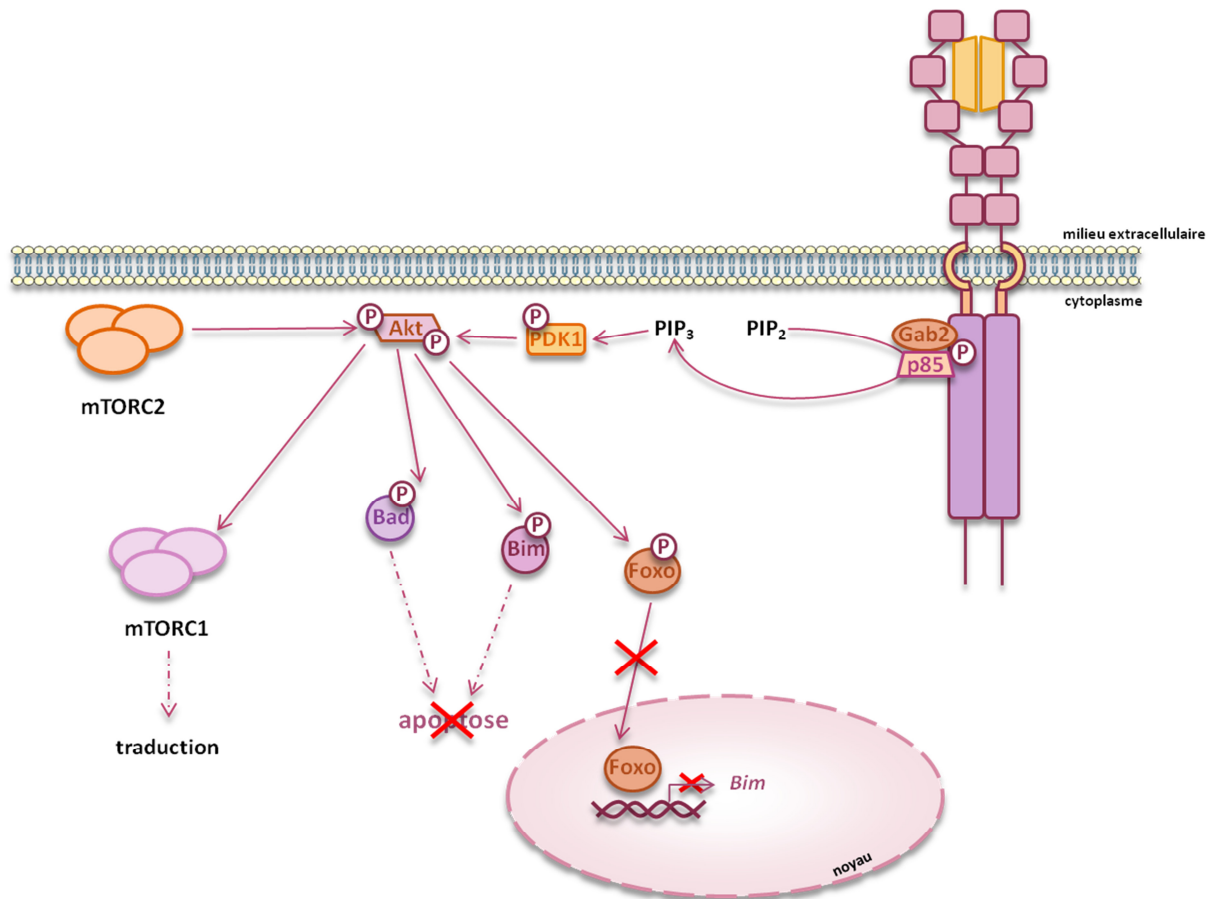


Figure 12 : Voie de signalisation PI3K/Akt en aval de l'activation du récepteur c-Kit par son ligand

Après activation de c-Kit par le SCF, l'axe de signalisation PI3K/Akt est initié par la liaison directe ou indirecte de p85 à la tyrosine 721 de c-Kit.

En absence de signaux de survie, la protéine pro-apoptotique Bad s'associe et neutralise des protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-X_L ou Bcl-2 (Yang *et al.*, 1995). Lorsqu'Akt est active, Bad est phosphorylée et se dissocie des complexes auxquels elle appartient. Une fois libre, elle est séquestrée dans le cytoplasme par les protéines 14.3.3 puis envoyée en dégradation (Zha *et al.*, 1996). De plus, Akt permet la phosphorylation de Bim, qui est alors également dégradée.

Ces effets anti-apoptotiques sont combinés à des effets « pro-survie », *via* la phosphorylation des facteurs de transcription de la famille Foxo. Une fois phosphorylés, ces derniers sont séquestrés dans le cytoplasme, et ne peuvent donc plus pénétrer dans le noyau où ils initient la synthèse de protéines pro-apoptotiques telle que Bim (Engström *et al.*, 2003).

Pour être complètement active, Akt a besoin d'être phosphorylée sur deux résidus, la thréonine 308 (par PDK1) et la sérine 473, par le complexe mTORC2 (mammalian Target Of Rapamycin Complex 2). Il est à noter que la phosphorylation de la sérine 473 est indispensable à la phosphorylation de la thréonine 308 (Scheid *et al.*, 2002).

b) La voie JAK/STAT

La tyrosine kinase Jak2 (Janus Kinase 2) interagit de manière constitutive avec le récepteur c-Kit sauvage (Weiler *et al.*, 1996).

Suite à la liaison du SCF, c-Kit s'active et phosphoryle de façon rapide et transitoire la protéine Jak2 (Brizzi *et al.*, 1994) (Linnekin *et al.*, 1996). Une fois actifs, c-Kit et Jak2 induisent la phosphorylation des facteurs de transcription STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription) 1, 3 et 5 localisés dans le cytoplasme (Deberry *et al.*, 1997) (Gotoh *et al.*, 1996) (Ryan *et al.*, 1997). Dès lors, ces derniers se dimérisent, *via* leurs domaines SH2 (Brizzi *et al.*, 1999), et sont transloqués dans le noyau où ils initient la transcription de plusieurs gènes, tel que *c-myc*, *Bcl-xL* ou *c-fos*, impliqués, entre autre, dans l'apoptose et la différenciation cellulaire (Figure 13).

Cependant, l'activation de la signalisation Jak2/STAT, et en particulier la phosphorylation de STAT5, *via* c-Kit reste controversée. Ces observations paradoxales peuvent être expliquées par le contexte cellulaire des différentes études, ainsi que par le caractère transitoire de l'activation de Jak2 et de STAT5.

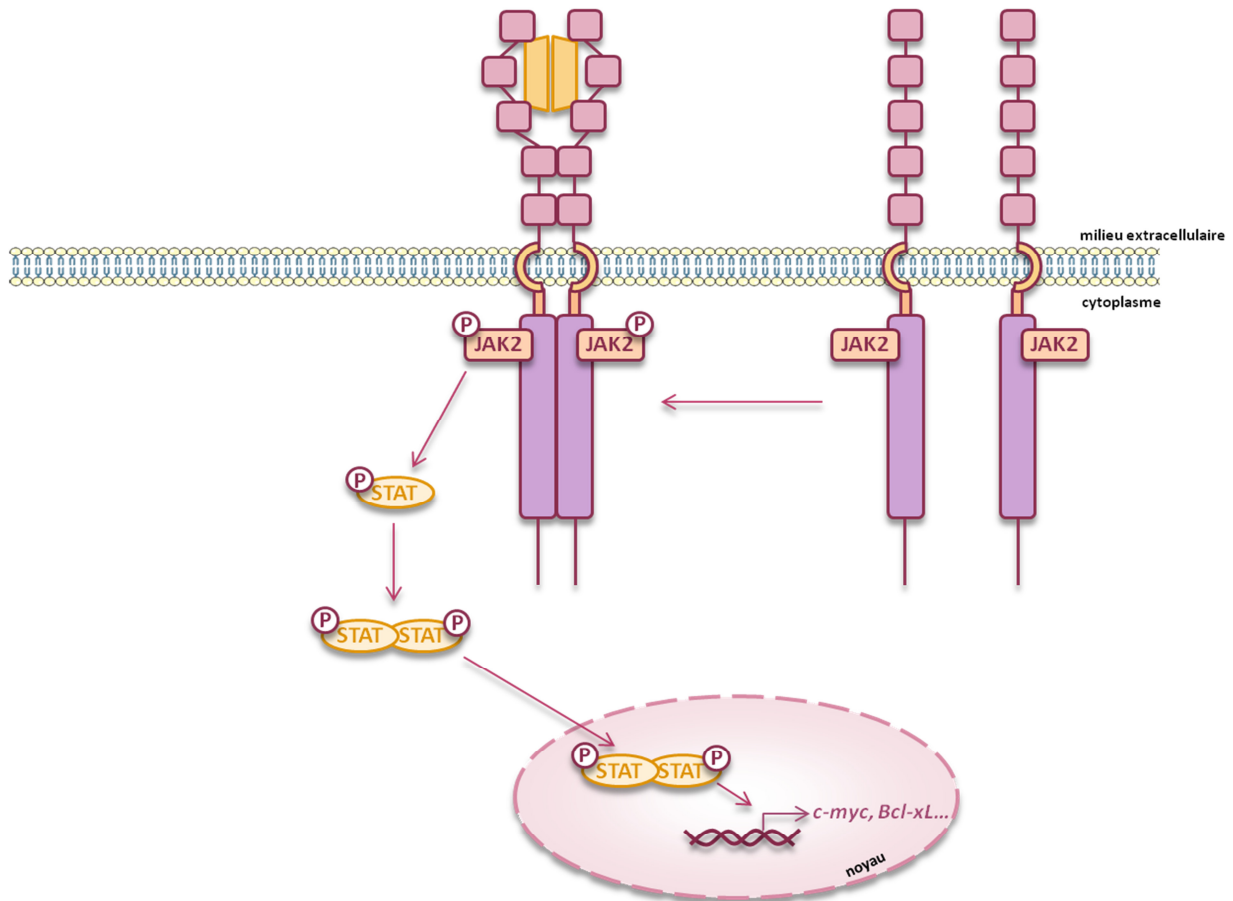


Figure 13 : Voie de signalisation Jak/STAT en aval de l'activation du récepteur c-Kit par son ligand.

Après activation de c-Kit par le SCF, l'axe de signalisation Jak/STAT est initié par la phosphorylation de Jak2, constitutivement lié à c-Kit.

c) La voie des MAP kinases

L'activation de la signalisation MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase)/Erk (Extracellular signal-regulated kinase) en aval de c-Kit, début par la liaison du complexe SOS (Son Of Sevenless)/Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2) à la tyrosine phosphorylée 701 du récepteur c-Kit. La fixation de ce complexe au récepteur activé peut également être indirecte, *via* les protéines SHP2 et Shc (Lennartsson *et al.*, 1999).

SOS est un facteur d'échange nucléotidique qui permet de remplacer le GDP, lié à la GTPase membranaire RAS, par une molécule de GTP. Ainsi activée, RAS induit la phosphorylation de la sérine/thréonine kinase Raf, qui à son tour phosphoryle Mek1 et

Mek2 (Map-kinases kinases), les activateurs de Erk1 et Erk2 (Herbst *et al.*, 1991). Erk1 et Erk2 phosphorylés vont alors induire l'activation de facteurs de transcription tels que c-Fos ou Elk1 et de protéines cytoplasmiques telles que Rsk.

Erk 1 et Erk 2 peuvent également activer p38 et Jnk, *via* Rac1, ainsi que Erk5 (Figure 14).

L'activation d'Erk1/2 reste néanmoins cellule et tissus dépendant. En effet, en 2004, Wandzioch *et al.* montre que l'activation d'Erk1/2 dans les CSH ainsi que dans les progéniteurs hématopoïétiques communs, est médiée par la signalisation PI3K, alors que dans les mastocytes matures, cette activation est dépendante de RAS (Wandzioch *et al.*, 2004).

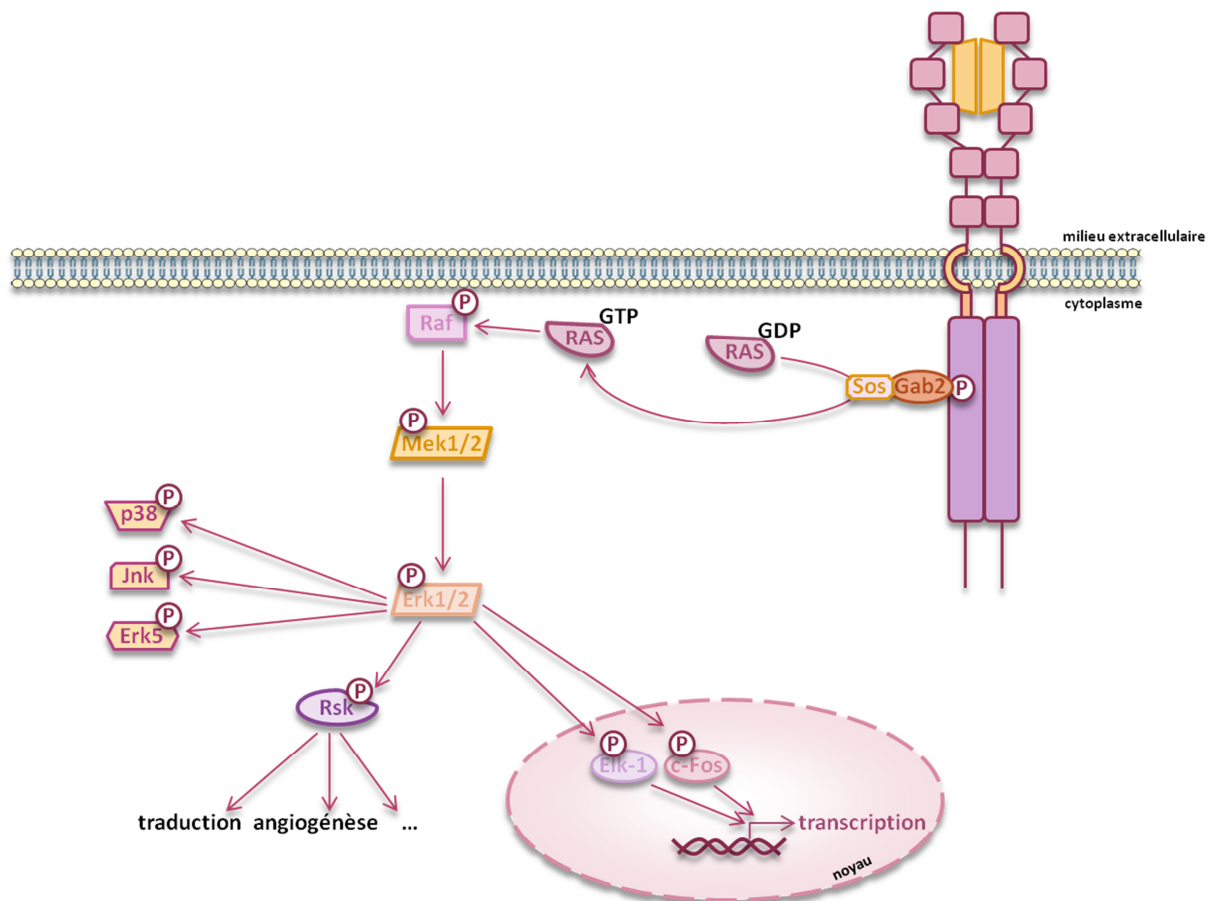


Figure 14 : Voie de signalisation MAPK/Erk en aval de l'activation du récepteur c-Kit par son ligand

Après activation de c-Kit par le SCF, l'axe de signalisation MAPK/Erk est initié par la liaison directe ou indirecte du complexe SOS-Grb2 à la Y701 de c-Kit.

d) La famille des Src Kinase (SFK)

La famille des Src kinase (SFK) regroupe huit membres. Certains sont exprimés de façon ubiquitaire (c-Src, Yes et Fyn) et d'autres ont une expression restreinte au compartiment hématopoïétique (Lck, Hck, Lyn, Fgr et Blk). Par exemple, les lymphocytes T expriment principalement Fyn et Lck, les lymphocytes B expriment majoritairement Lyn et Blk, alors que les cellules myéloïdes expriment Lyn, c-Src, Fgr et Hck.

Ces protéines partagent une structure et un mode d'activation communs. De l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale, les SFK présentent un domaine d'ancrage à la membrane, un domaine SH3, un domaine SH2, un domaine de liaison (linker), un domaine catalytique et un domaine C-terminal contenant une tyrosine d'inactivation. Le domaine catalytique est divisé en deux lobes, le lobe N et le lobe C, séparés par la boucle d'activation. Sous forme inactive, les SFK arborent une structure fermée, maintenue par l'interaction du domaine SH2 avec la tyrosine inhibitrice présente en C-terminale, et du domaine « linker » avec le domaine SH3. Cette conformation auto-inhibée des SFK est levée après déphosphorylation de la tyrosine inhibitrice, ou par des liaisons compétitives des domaines SH2 et SH3 (pour revue : Ingley, 2008) (**Figure 15**).

Ces protéines jouent un rôle majeur dans la signalisation en aval des RTK et se fixent, *via* leurs domaines SH2, aux tyrosines 568 et 570 de c-Kit.

En 2004, Hong *et al.* substitue toutes les tyrosines phosphorylables de c-Kit par des phénylalanines, et montre que l'unique restauration des tyrosines 567 et 569 (équivalents des tyrosine 568 et 570 chez la souris) est capable d'initier la signalisation MAPK/Erk (Hong *et al.*, 2004). Cependant, la nécessité des SFK pour la signalisation MAPK/Erk est cellule spécifique. En effet, en 2009, Agosti *et al.* montre, dans un modèle érythroïde murin, que l'absence de liaison des SFK à c-Kit n'abolit pas cette signalisation, alors que la voie AKT est diminuée (Agosti *et al.*, 2009).

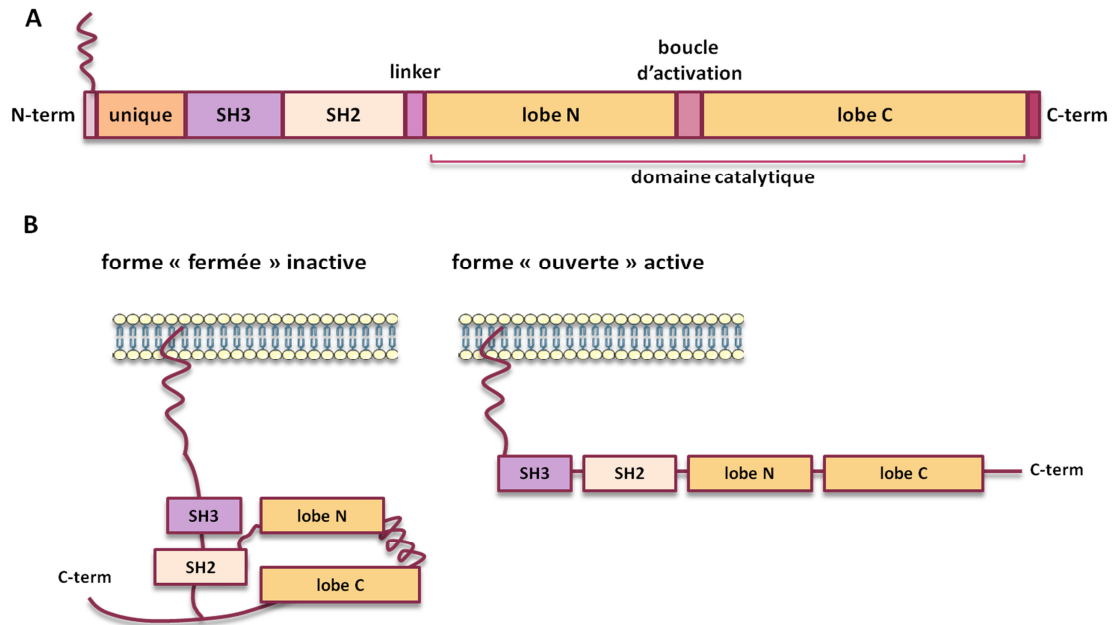


Figure 15 : Structure schématique et principe de régulation des SFK

A. Représentation schématique de la structure commune des membres de la famille des Src kinase.
B. Représentation schématique de l'activation des membres de la famille des Src kinase.

Des études menées sur des mastocytes primaires murins, ont montré que l'inactivation de Lyn conduit à une régulation négative de la signalisation en aval d'Akt, alors que l'activation des protéines Jnk et STAT3 ne sont pas touchée. De plus, l'inactivation de Fyn ne semble pas moduler la phosphorylation d'Akt, mais régule négativement la phosphorylation de p38 (Shivakrupa and Linnekin, 2005) (Samayawardhena *et al.*, 2006).

Il a également été montré, dans un modèle de cellules à potentialité mégacaryocytaire (Mo7E), que Lyn est impliquée dans le cycle cellulaire, en permettant la transition des phases G1/S (Mou and Linnekin, 1999) et dans leur processus de migration (O'Laughlin-Bunner *et al.*, 2001).

En 2001, Nishio *et al.* traite des précurseurs érythroïdes humains avec un inhibiteur pharmacologique des SFK, le PP2 (Pyrazolo-Pyrimidine 2), et montre que le caractère protecteur du SCF sur l'apoptose, médié par le récepteur de mort Fas, est abolie (Nishio *et al.*, 2001). Il est à noter qu'à de plus fortes concentrations, cet inhibiteur peut également inhiber d'autres protéines à activité tyrosine kinase, telles que c-Kit.

Par ailleurs, les SFK interviennent également dans l'internalisation et la dégradation de c-Kit après son activation par les SCF (cf partie c) *Internalisation et dégradation de c-Kit – c-Cbl et protéasome*).

5. Régulation négative de c-Kit

Afin de ne pas aboutir à des effets aberrants, la signalisation en aval de c-Kit est finement contrôlée. Cette régulation négative implique différents acteurs clairement identifiés.

a) *Déphosphorylation des tyrosines*

Suite à l'activation de c-Kit par son ligand, la tyrosine phosphatase SHP-1 (Src Homology-2 containing Phosphatase-1) est recrutée *via* la tyrosine 568 du récepteur, et provoque la déphosphorylation des tyrosines phosphorylées de c-Kit (Kozlowski *et al.*, 1998) (Paulson *et al.*, 1996), entraînant par conséquent l'extinction de sa signalisation en aval.

b) *Phosphorylation des sérines*

En aval de c-Kit, la sérine/thréonine kinase PKC est activée. Celle-ci exerce une régulation négative sur le récepteur actif, *via* sa fixation directe aux sérines 741 et 746, situées au cœur du domaine KID. Ceci a pour conséquence l'inhibition de l'activité kinase du récepteur (Blume-Jensen *et al.*, 1994) (Blume-Jensen *et al.*, 1995).

c) *Internalisation et dégradation de c-Kit*

Deux axes moléculaires peuvent aboutir à l'internalisation et à la dégradation de c-Kit. Dans un premier cas, c-Kit actif va être internalisé et dégradé par le protéasome, *via* l'ubiquitine E3 ligase c-Cbl, et dans un deuxième cas, l'internalisation du récepteur implique le processus d'endocytose et une dégradation par le lysosome (**Figure 16**).

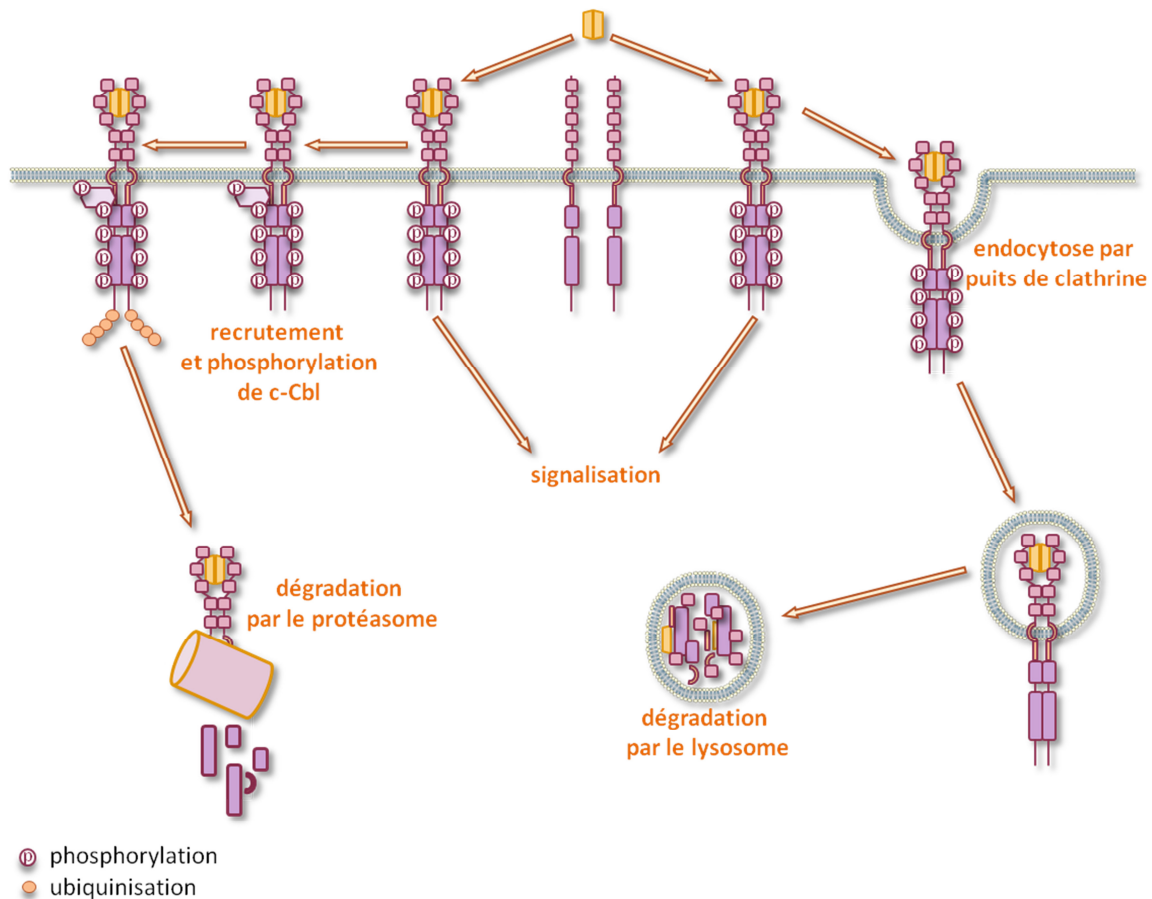


Figure 16 : Schéma des processus de dégradation de c-Kit après activation par son ligand

Après activation par son ligand, c-Kit est internalisé et dégradé, soit par un processus impliquant l'ubiquitine E3-ligase et le protéasome, soit par endocytose et dégradation lysosomale.

- **c-Cbl et protéasome** : Après activation, l'ubiquitine E3 ligase c-Cbl se lie à c-Kit, soit de façon directe, *via* son domaine SH2, au niveau des tyrosines phosphorylées 568 et 570 (Masson *et al.*, 2006), soit de façon indirecte, *via* Grb2, aux tyrosines phosphorylées 703 et 936 (Sun *et al.*, 2007) ou enfin *via* la protéine adaptatrice APS (Adaptator Protein with SH2 domain) aux tyrosines 568 et 936 (Wollberg *et al.*, 2003).

Suite à sa liaison à c-Kit, c-Cbl est activée par les SFK, permettant ainsi la poly-ubiquitination de c-Kit, suivie de son internalisation et de sa dégradation par le protéasome (Miyazawa *et al.*, 1994) (Wisniewski *et al.*, 1996) (Masson *et al.*, 2006). Il est à noter que des mutations inhibitrices de c-Cbl sont impliquées dans de nombreuses pathologies. Par exemple, la mutation c-CblR420Q participe à la transformation des syndromes

myélodisplasiques (SMD) de hauts risques en leucémies aigües myéloïdes (LAM), *via* la suractivation d'un autre RTK de classe III, Flt-3 (Reindl *et al.*, 2009). Il a également été montré que cette mutation, ainsi que la mutation inhibitrice 70Z, caractérisée par la délétion de 17 acides aminés à la limite du domaine de liaison et du domaine à doigt de zinc de c-Cbl, inhibaient l'internalisation et la dégradation *via* le protéasome de c-Kit (Bandi *et al.*, 2009).

- **Endocytose et lysosome** : l'accumulation de c-Kit actif au niveau de la membrane plasmique, mais plus particulièrement au niveau des rafts ou « radeaux lipidiques », provoque la mise en place d'un processus d'endocytose, conduisant le récepteur jusqu'au lysosome, où il sera alors dégradé (Sorkin *et al.*, 1995) (Robinson, 1994). Cette voie d'internalisation et de dégradation est indépendante des SFK (Broudy *et al.*, 1999), mais est largement régulée par le flux calcique et la signalisation en aval de PI3K (Gommerman *et al.*, 1997).

6. Le couple SCF/c-Kit dans l'érythropoïèse

Le couple formé par c-Kit et son ligand, joue un rôle majeur dans l'hématopoïèse, mais plus particulièrement dans la différenciation, la survie et la prolifération des cellules érythroïdes.

c-Kit est exprimé à la surface d'approximativement 70% des cellules CD34⁺ de la moelle osseuse, dont les progéniteurs communs lymphoïdes et myéloïdes, ainsi que les cellules hématopoïétiques immatures (Ashman *et al.*, 1991) (Papayannopoulou *et al.*, 1991). Il est également fortement exprimé à la surface des progéniteurs myéloïdes, alors que les progéniteurs lymphoïdes l'expriment peu ou pas. Les rares cellules hématopoïétiques matures exprimant c-Kit sont les mastocytes, les éosinophiles et une sous catégorie de cellules lymphoïdes, les Natural Killer (NK) (Escribano *et al.*, 1998) (Lennartsson *et al.*, 2005) (**Figure 17**).

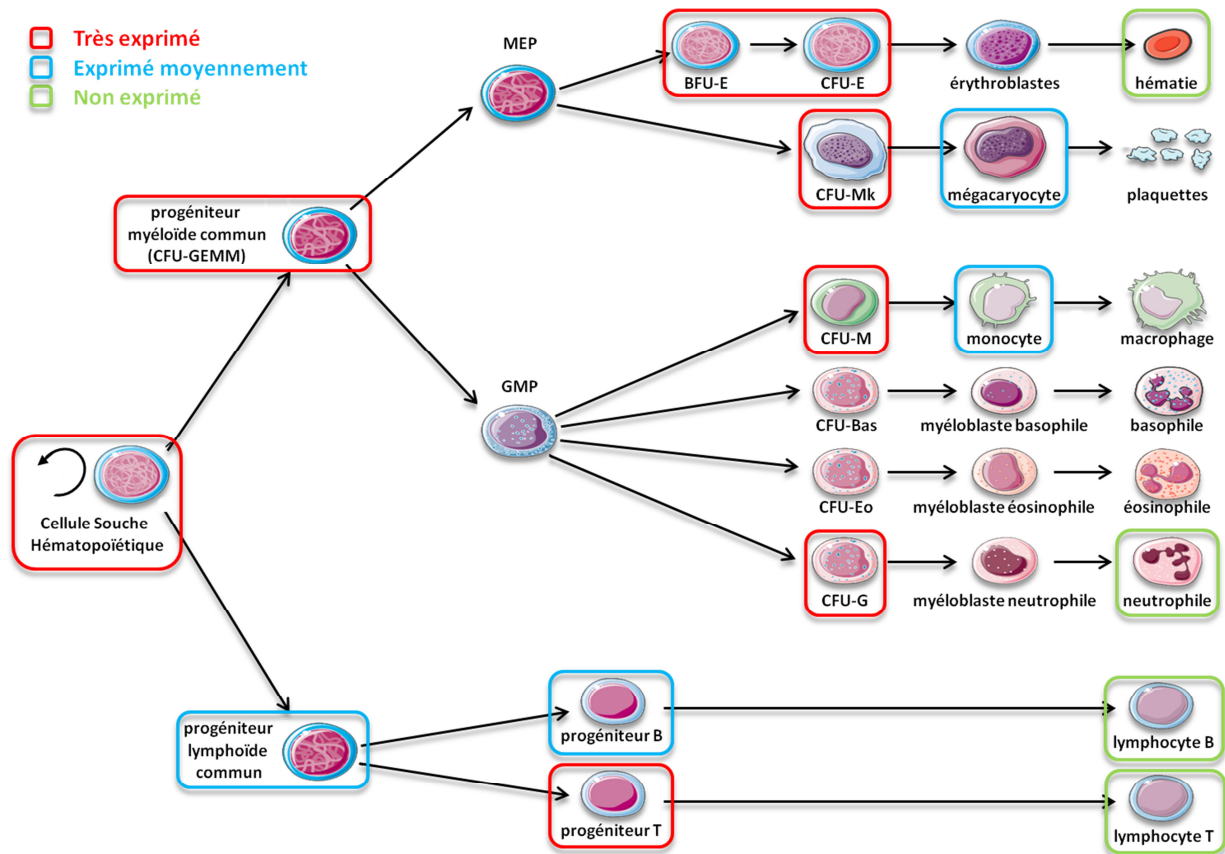


Figure 17 : Expression différentielle du récepteur c-Kit à la membrane des cellules hématopoïétiques (d'après Lennartsson *et al.* 2005)

c-Kit est fortement exprimé à la surface de la cellule souche hématopoïétique, du progéniteur myéloïde, des BFU-E (Burst Forming Unit-Erythroid), CFU-Mk (Colony Forming Unit-Megakaryocyte), CFU-M (Colony Forming Unit-Macrophage), CFU-G (Colony Forming Unit-Granulocyte) et CFU-E (Colony Forming Unit-Erythroid). Il est moyennement exprimé par le progéniteur lymphoïde B, le mégacaryocyte et le monocyte. Il n'est pas exprimé par l'érythroblaste en fin de différenciation, le neutrophile, le lymphocyte T et le lymphocyte B.

Au cours de la différenciation érythroïde, c-Kit est fortement exprimé à la surface des BFU-E et des CFU-E (Ogawa *et al.*, 1991), puis son expression diminue avec l'entrée des cellules en phase terminale de différenciation (Uoshima *et al.*, 1995). Il a été montré en 1995, que le maintien de SCF dans le milieu de culture de progéniteurs érythroïdes ralentissait leur différenciation et augmentait ainsi le pool de cellules immatures (Muta *et al.*, 1995).

De plus, la signalisation en aval de c-Kit permet de diminuer l'apoptose induite ou spontanée des cellules érythroïdes (Lu *et al.*, 1999) (Iemura *et al.*, 1994). En effet, comme expliqué précédemment, la production des progéniteurs érythroblastiques est régulée par le système Fas/Fas-L. Une étude menée sur des érythroblastes primaires et portant sur l'activation de la signalisation en aval du récepteur Fas, induite par un traitement au CH11 (anticorps agoniste de Fas), a montré que le SCF inhibe l'activation des caspases 3 et 7 *via* l'activation de la kinase Lyn (Nishio *et al.*, 2001). Le rôle anti-apoptotique de c-Kit passe également par l'activation, dépendante des SFK (Src Family Kinase), de la sérine/thréonine kinase Akt. En effet, l'ajout de PP2, inhibe la phosphorylation de la sérine 473 d'Akt, et induit l'apoptose des érythroblaste exprimant c-Kit (Endo *et al.*, 2001).

Le couple SCF/c-Kit semble également intervenir dans le maintien des érythroblastes au sein de l'îlot érythroblastique. En 1995, l'équipe de Simmons a montré qu'un traitement au SCF renforce l'adhésion des cellules CD34⁺ normales à la fibronectine, synthétisée par le macrophage central (Lévesque *et al.*, 1995). De plus, des progéniteurs issus de souris hétérozygotes pour le gène codant c-Kit présentent une moins bonne adhésion aux cellules stromales que des progéniteurs issus de souris contrôles (Kodama *et al.*, 1994). Moléculairement, ces observations ne sont pas le reflet d'une perte d'expression des intégrines par les érythroblastes, mais d'une diminution de leur avidité pour VCAM-1 et la fibronectine (Kovach *et al.*, 1995).

7. Fonctions non érythroïdes du couple SCF/c-Kit

Outre son rôle dans l'hématopoïèse, et plus particulièrement au cours l'érythropoïèse, le couple SCF/c-Kit est impliqué dans de nombreuses autres fonctions physiologiques.

a) Maturation et fonctions des mastocytes

Les mastocytes sont des cellules d'origine hématopoïétique, impliquées dans la réponse immunitaire innée et majoritairement localisées au niveau du tissu conjonctif. Une fois activées, ces cellules granuleuses libèrent par exocytose le contenu de leurs vésicules,

permettant ainsi l'initiation de la réponse inflammatoire et le recrutement d'acteurs de la réponse immunitaire adaptative.

Le couple SCF/c-Kit est intimement lié aux processus de maturation, de différenciation et de prolifération des mastocytes. En effet, le SCF est décrit comme étant le principal facteur de croissance de ces cellules (Galli et al., 1995) (Hundley et al., 2004) et l'expression de c-Kit à la surface des mastocytes matures permet de soutenir leur prolifération tout en inhibant leur apoptose (Mekori et al., 1995). De plus, il a été montré que le SCF a un pouvoir chimio-attractant et permet l'adhésion des mastocytes à la matrice extracellulaire (Hundley et al., 2004). Enfin, l'activation de c-Kit par le SCF peut activer les mastocytes et par conséquent initier leur dégranulation et la production de cytokines pro-inflammatoires (Okayama and Kawakami, 2006) (Ray et al., 2010).

b) Mélanocytogenèse et pigmentation

Les mélanocytes sont des cellules dendritiques pigmentaires issues de la crête neurale et situées au niveau de la couche basale de l'épiderme (entre la couche épineuse et la jonction dermo-épidermique).

Plusieurs études ont mis en évidence le rôle fondamental de l'axe de signalisation SCF/c-Kit dans la prolifération, la survie et la migration des mélanocytes, tant durant la vie embryonnaire que durant la vie adulte (Scott et al., 1994) (Mackenzie et al., 1997) (Wehrle-Haller, 2003). De plus, il apparaît que l'activation de MITF (Microphthalmia-associated transcription factor) et de la tyrosinase, acteurs essentiels de la mélanogenèse, est dépendante de la signalisation médiée par c-Kit (Luo et al., 1995) (Hachiya et al., 2009) (Phung et al., 2011).

c) Motricité des cellules interstitielles de Cajal

D'origine mésenchymateuse, les cellules interstitielles de Cajal sont localisées au niveau de la paroi de l'intestin et contrôlent la fréquence et la propagation des contractions intestinales.

c-Kit apparaît comme étant un marqueur spécifique de ces cellules et joue un rôle primordial dans leur différenciation (Torihashi et al., 1995) (Sanders et al., 1999) ainsi que

dans leur fonctionnalité (Ward et al., 1994). Il est à noter que l'injection intrapéritonéale d'anticorps bloquants dirigés contre c-Kit (ACK2) dans des souris BALB/c sauvages, induit une altération du pouvoir contractile de l'intestin (Maeda et al., 1992).

d) Gamétogenèse

Les cellules germinales primordiales sont des cellules embryonnaires, précurseurs des gamètes mâles et femelles. L'activation de la signalisation en aval de c-Kit, mais principalement de la voie PI3K/Akt, permet à ces cellules de migrer le long des cellules stromales, productrices de SCF, vers les crêtes génitales, tout en assurant leur survie et leur prolifération (Kissel et al., 2000) (Farini et al., 2007) (Gu et al., 2009). Après la naissance, cet axe de signalisation est impliqué dans la prolifération, la survie et la différenciation des spermatogonies ainsi que dans l'entrée en méiose (pour revue Mithraprabhu and Loveland, 2009), mais également dans l'ovogenèse, *via* l'expression de c-Kit par les ovocytes et la synthèse de SCF par les cellules de la granulosa (pour revue Merkwitz et al., 2011).

B. Le couple EPO/R-EPO

1. L'érythropoïétine (EPO)

L'érythropoïétine est une glycoprotéine de 165 acides aminés, d'une masse moléculaire de 18kDa, puis de 38kDa lorsqu'elle est glycosylée, donc active (Miyake *et al.*, 1977).

En 1905, Paul Carnot et son étudiante en thèse, Clotilde Deflandre ont injecté du sérum de lapin anémique dans un lapin normal, et ont observé une augmentation importante de la production de globule rouge. Le terme d'hémopoïétine est alors utilisé.

En 1977, la protéine est purifiée à partir d'urine de patients aplasiques (Miyake *et al.*, 1977), puis clonée en 1985 (Lin *et al.*, 1985) (Jacobs *et al.*, 1985). Ce clonage a permis la fabrication d'EPO recombinante humaine, toujours utilisée dans le traitement des anémies.

C'est en 1995, que l'inactivation du gène codant pour l'EPO est réalisée, par recombinaison homologue (Wu *et al.*, 1995a). Dans ces travaux menés chez la souris, les auteurs montrent que l'hétérozygotie est viable, alors que l'extinction complète du gène est

létale pour l'animal, entre 13 et 15 jours de gestation. Les fœtus présentent une anémie sévère, due à une absence de CFU-E, alors que des BFU-E sont préservées dans le foie foetal. Ces résultats montrent le rôle majeur de l'EPO dans la prolifération et la différenciation terminale des érythrocytes, mais également son important rôle dans la protection des CFU-E de l'apoptose.

Pendant la vie embryonnaire, la synthèse d'EPO se fait dans le foie fœtal (Koury *et al.*, 1993). Chez l'adulte l'EPO est d'origine rénale, principalement synthétisée par les cellules interstitielles péritubulaires (Koury *et al.*, 1991) (Lacombe *et al.*, 1988). Il existe aussi une faible production d'EPO soutenue par les hépatocytes (Zanjani *et al.*, 1977).

L'expression et la synthèse d'EPO est finement régulée. Elle est sous le contrôle de facteurs de transcription, eux-mêmes sous le contrôle de conditions environnementales. L'hypoxie, due à une anémie, à l'insuffisance cardiaque ou encore à l'altitude, est un des régulateurs majeurs de la production d'EPO. En effet, celle-ci stimule la synthèse d'EPO, et donc l'érythropoïèse.

Le gène de l'EPO présente en sa partie 3' une région HRE (pour Hypoxia Responsive Element). En conditions hypoxiques, les facteurs de transcription HIF1 et HIF2 (pour Hypoxia Inducible Factor) se dimérisent, se fixent à cette région et initient la transcription de l'EPO (Pugh *et al.*, 1991) (Semenza and Wang, 1992).

La Ferla *et al.* montre en 2002, qu'un blocage de la signalisation en aval du facteur de transcription NFκB *via* un dominant négatif de la protéine inhibitrice IκBα, induit, en conditions hypoxiques, une augmentation de la synthèse d'EPO en réponse aux cytokines pro-inflammatoires IL-1β et TNFα (La Ferla *et al.*, 2002).

De plus, des études menées dans la lignée cellulaire hépatique Hep3B ont montré que les facteurs de transcription GATA-1, -2 et -3 inhibent la synthèse de l'ARNm de l'EPO, par blocage de son promoteur (Imagawa *et al.*, 1997). Il est à noter que ces trois membres de la famille GATA sont exprimés dans le compartiment hématopoïétique, et que GATA-1 et -2 jouent un rôle majeur dans la différenciation érythroïde.

2. R-EPO, le récepteur de l'EPO

Le récepteur de l'érythropoïétine, R-EPO, est une glycoprotéine de 507 acides aminés (D'Andrea *et al.*, 1989) et d'une masse moléculaire initiale de 52kDa, qui, une fois glycosylée, migre en conditions réduites, à 66kDa (Jones *et al.*, 1990).

Ce récepteur fait parti de la famille des récepteurs de cytokine de classe I (Bazan, 1989) (**Figure 18**).

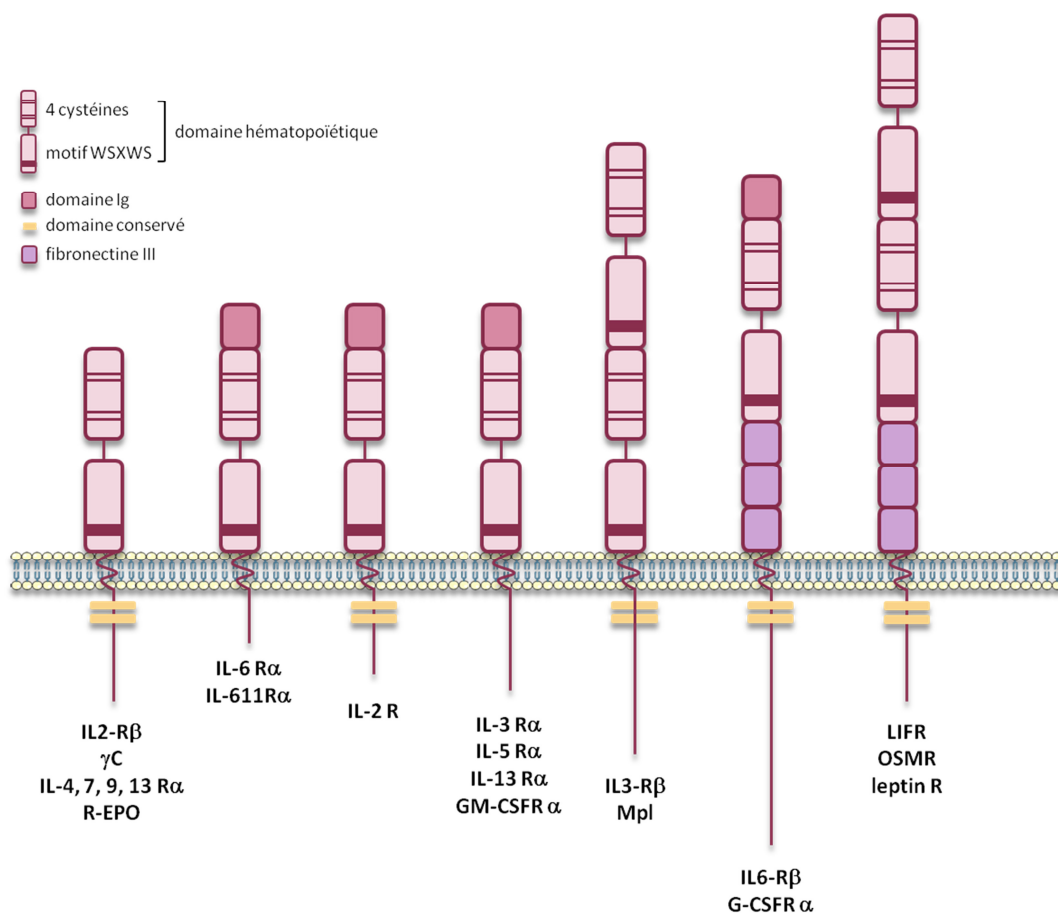


Figure 18 : Représentation des membres de la famille des récepteurs à cytokine de classe I

Les récepteurs à cytokine de classe I (aussi appelés récepteurs à hémopoïétine) sont des récepteurs transmembranaires qui présentent tous une partie extracellulaire avec 4 cystéines, impliquées dans la dimérisation des récepteurs, et un motif WSXWS (ou X est un acide aminé aléatoire), impliqué dans sa liaison à la cytokine.

Comme tous les membres de la famille des récepteurs à cytokine de classe I, R-EPO est divisé en trois domaines (McCaffery *et al.*, 1989):

- un domaine extracellulaire de 223 acides aminés, constitué de deux domaines Ig-like, de résidus cystéines conservés, permettant la formation de ponts disulfures impliqués dans la dimérisation du récepteur, de groupements aromatiques et d'un motif SWXWS, impliqué dans le repliement du récepteur et caractéristique des membres de cette famille.
- un domaine transmembranaire hydrophobe de 24 acides aminés.
- un domaine intracellulaire de 236 acides aminés, composé d'une région proximale, point d'ancrage de Jak2 (Witthuhn *et al.*, 1993), et d'une région distale possédant 8 tyrosines, qui, une fois phosphorylées après liaison de l'EPO, deviennent les sites d'ancrage de différents acteurs de la signalisation en aval du récepteur.

Le récepteur de l'érythropoïétine est faiblement exprimé à la membrane des BFU-E (Sawada *et al.*, 1990). Son expression est maximale au stade CFU-E (Broudy *et al.*, 1991), puis diminue progressivement au cours de la différenciation érythroïde (Broudy *et al.*, 1991) (Wickrema *et al.*, 1992).

Mais R-EPO n'est pas uniquement exprimé par les cellules érythroïdes. En effet, il est retrouvé à la membrane de certaines cellules cancéreuses, des astrocytes et des neurones (Juul *et al.*, 1999), des cellules utérines (Yasuda *et al.*, 1998) ou encore des cellules rénales (Westenfelder *et al.*, 1999).

Le couple EPO/R-EPO est également acteur d'autres mécanismes physiologiques. Par exemple, dans un contexte ischémique, il favorise l'angiogenèse en induisant la sécrétion du VEGF (Vascular Endothelial Growth factor) (Nakano *et al.*, 2007). Dans un modèle de souris sujettes aux AVC (Accident Vasculaire Cérébral), il a été montré que le couple EPO/R-EPO soutient la neurogenèse en stimulant la sécrétion de BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) (facteur de croissance permettant la prolifération et la différenciation des neurones et des synapses) par les cellules endothéliales du cerveau (Shingo *et al.*, 2001) (Wang *et al.*, 2004).

Enfin, l'inactivation complète du gène codant le R-EPO, induit un phénotype létal entre 13 et 15 jours de gestation, et l'inactivation partielle hétérozygote provoque une anémie sévère comparable à celle due à l'inactivation partielle du gène de l'EPO.

3. Liaison EPO/R-EPO et signalisation en aval

Contrairement à de nombreux récepteurs de cytokine de classe I, qui sont activés par homodimérisation faisant suite à la fixation de leur ligand, R-EPO est présent à la membrane plasmique sous forme d'homodimère (Livnah *et al.*, 1999) (Constantinescu *et al.*, 2001), et sa signalisation est déclenchée par la fixation de son ligand (**Figure 19**).

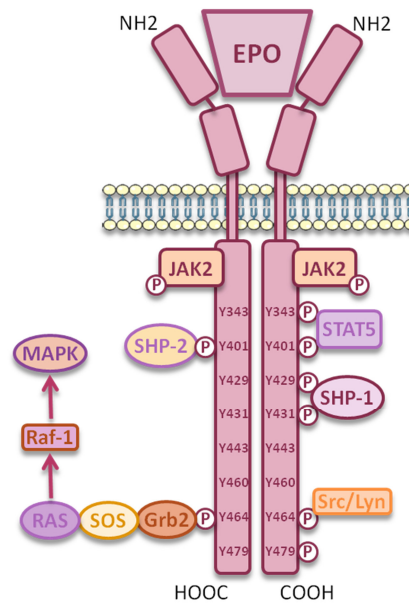


Figure 19 : Schéma du récepteur de l'érythropoïétine et des voies de signalisation activée

Le récepteur de l'érythropoïétine (R-EPO) est un récepteur transmembranaire qui une fois activé par la liaison de son ligand, l'érythropoïétine (EPO) est phosphorylé. Une fois actif, ses tyrosines phosphorylées 343 et 401 deviennent la plateforme d'ancrage de STAT5, la tyrosine 401 de SHP-2, les tyrosines 429 et 431 de SHP-1, la tyrosine 464 lie des membres de la famille des Src kinase ainsi que Grb2 et la tyrosine 479 la sous-unité catalytique de PI3K, p85 α .

En 1990, Yoshimura *et al.* construit un mutant du R-EPO où l'arginine en position 129 est substituée par une cystéine. Cette mutation permet la formation d'un pont disulfure supplémentaire, conduisant à une modification structurale du récepteur. (Yoshimura *et al.*, 1990). Ce dernier est alors constitutivement actif, et de façon intéressante, la substitution de l'arginine en sérine, proline ou acide glutamique, ne pouvant former de nouveaux ponts disulfures ne confèrent pas au récepteur une activation constitutive (Watowich *et al.*, 1994). Des études ont montré qu'en absence d'EPO, ce récepteur mutant est capable d'initier la

prolifération des CFU-E (Longmore *et al.*, 1994) (Pharr *et al.*, 1993) et que les souris l'exprimant de façon ectopique, présentent une érythrocytose et une splénomégalie (Longmore and Lodish, 1991) (Longmore *et al.*, 1993).

Ces résultats suggèrent donc que l'activation du R-EPO nécessite son homodimérisation ainsi que sa réorganisation structurale.

R-EPO n'a pas d'activité enzymatique propre. Dès sa sortie du réticulum endoplasmique, la forme immature du R-EPO va se lier à la kinase Jak2 (Huang *et al.*, 2001). Dans un premier temps, cette kinase permet le repliement et le transport du R-EPO jusqu'à la membrane plasmique, puis, après activation du récepteur, elle lui confère une activité kinase. Il a d'ailleurs été montré que les souris déficientes pour le gène codant Jak2 avaient un phénotype similaire aux souris déficientes pour le gène codant le R-EPO ou l'EPO, voire plus drastique. (Neubauer *et al.*, 1998).

Suite à la liaison de l'EPO, le R-EPO change de conformation (Remy *et al.*, 1999). Les deux domaines intracellulaires se rapprochent, induisant la transphosphorylation de Jak2 (Witthuhn *et al.*, 1993), lui-même impliqué dans la phosphorylation des huit tyrosines du domaine intracellulaire de R-EPO (Ihle *et al.*, 1993). Une fois phosphorylées, ces tyrosines deviennent les sites de liaison des premiers acteurs des signalisations en aval du R-EPO. Parmi les molécules activées par le R-EPO, on retrouve les facteurs de transcription STAT5a et b, qui se lient aux tyrosines 343 et 401 (Chin *et al.*, 1996) (Quelle *et al.*, 1996), SHP-1 sur les tyrosines 429 et 431 (Klingmüller *et al.*, 1995), SHP-2 sur la tyrosine 401 (Tauchi *et al.*, 1996), la sous-unité catalytique de la PI3-K, p85, sur la tyrosine 479 (Miura *et al.*, 1994) et enfin sur la tyrosine 464, Grb2 et la Src kinase Lyn (Tauchi *et al.*, 1996) (**Figure 20**).

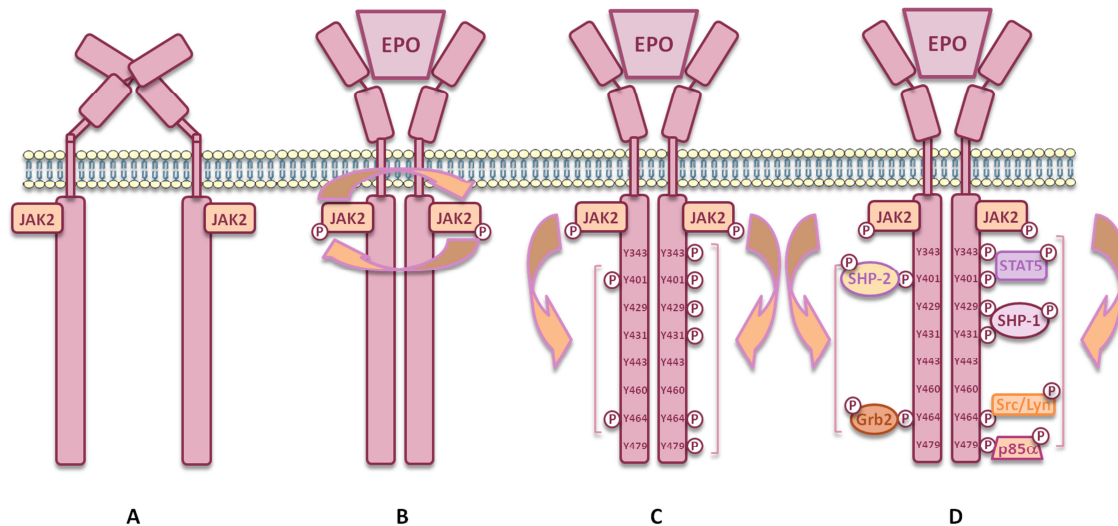


Figure 20 : Représentation schématique du mécanisme d'activation du récepteur de l'érythropoïétine (R-EPO) par son ligand

A. A la membrane des cellules, le récepteur de l'érythropoïétine est exprimé sous forme de dimère lié à la kinase Jak2. **B.** La fixation d'une molécule d'érythropoïétine entraîne un rapprochement des domaines intracellulaires des récepteurs impliqués. Les deux kinases Jak2 s'activent par transphosphorylation **C.** puis vont phosphoryler les résidus tyrosines du récepteur. **D.** Les protéines de signalisation s'associent ensuite au R-EPO phosphorylé et sont activées.

La petite protéine G_i est constitutivement liée à la partie C-terminale du R-EPO (Guillard *et al.*, 2001). Une fois que le récepteur est activé par son ligand, les sous-unités α et $\beta\gamma$ de la petite protéine G_i se dissocient et se détachent du R-EPO. Des études de la signalisation en aval du R-EPO ont montré que la sous-unité $\beta\gamma$ est impliquée dans l'activation des MAPK, et qu'un récepteur ne pouvant plus lier la petite protéine G_i , est incapable d'induire les phosphorylations d'Erk1/2 et d'Akt (Guillard *et al.*, 2003).

4. Régulation de la signalisation EPO/R-EPO

La demi-vie du R-EPO est relativement courte, 90 minutes, et sa phosphorylation en réponse à son ligand est transitoire, environ 30 minutes (Linnekin *et al.*, 1992) (Miura *et al.*, 1991).

Les 8 membres de la famille des SOCS (Suppressor Of Cytokine Signaling) présentent un domaine SH2 et régulent négativement la voie Jak/STAT. En 1999, des travaux menés sur des érythroblastes primaires ont mis en évidence la liaison de la protéine SOCS-3 à la tyrosine 1007 de Jak2 actif (Sasaki *et al.*, 1999). Cette liaison bloque partiellement la signalisation en aval du R-EPO, et est un pré-requis à la liaison de SOCS-3 à la tyrosine 401 du R-EPO. Cette deuxième liaison induit un blocage accru de l'activation du récepteur (Sasaki *et al.*, 2000). La protéine SOCS-1 peut également se lier à la tyrosine 401 du R-EPO. Cette interaction semble induire un encombrement stérique qui empêche la liaison de STAT5 au récepteur, et donc son activation (Matsumoto *et al.*, 1997).

L'extinction de la signalisation du R-EPO dépend également de la liaison de la phosphatase SHP-1 au R-EPO actif, qui induit une déphosphorylation de Jak2 (Jiao *et al.*, 1996).

Enfin, la protéine Lnk, aussi impliquée dans la modulation de la signalisation de c-Kit et de Mpl, récepteur de la thrombopoïétine (TPO), abolit l'expression membranaire du R-EPO (Tong *et al.*, 2005). Les souris déficientes pour le gène codant la protéine Lnk, présentent une augmentation du nombre de progéniteurs érythroïdes, et une sensibilité accrue à l'EPO, alors que la surexpression de cette protéine induit une apoptose massive des érythroblastes et inhibe la différenciation cellulaire dépendante de l'EPO (Velazquez *et al.*, 2002).

L'internalisation et la dégradation du R-EPO est dépendante de son activation par son ligand. Après liaison de l'EPO, l'ubiquitine E3-ligase β Trcp (pour β -Transducin repeat-containing protein) se lie à la sérine 462 du R-EPO et induit la dégradation partielle du domaine intracellulaire du récepteur par le protéasome. Il apparaît que cette dégradation soit dépendante de l'activation de Jak2, car l'utilisation d'AG490 (inhibiteur de l'activité kinase de Jak2) bloque l'interaction entre la β TRCP et le R-EPO (Meyer *et al.*, 2007). Le reste du récepteur et l'EPO lui-même sont quant à eux dégradés par le lysosome (Walrafen *et al.*, 2005) (**Figure 21**).

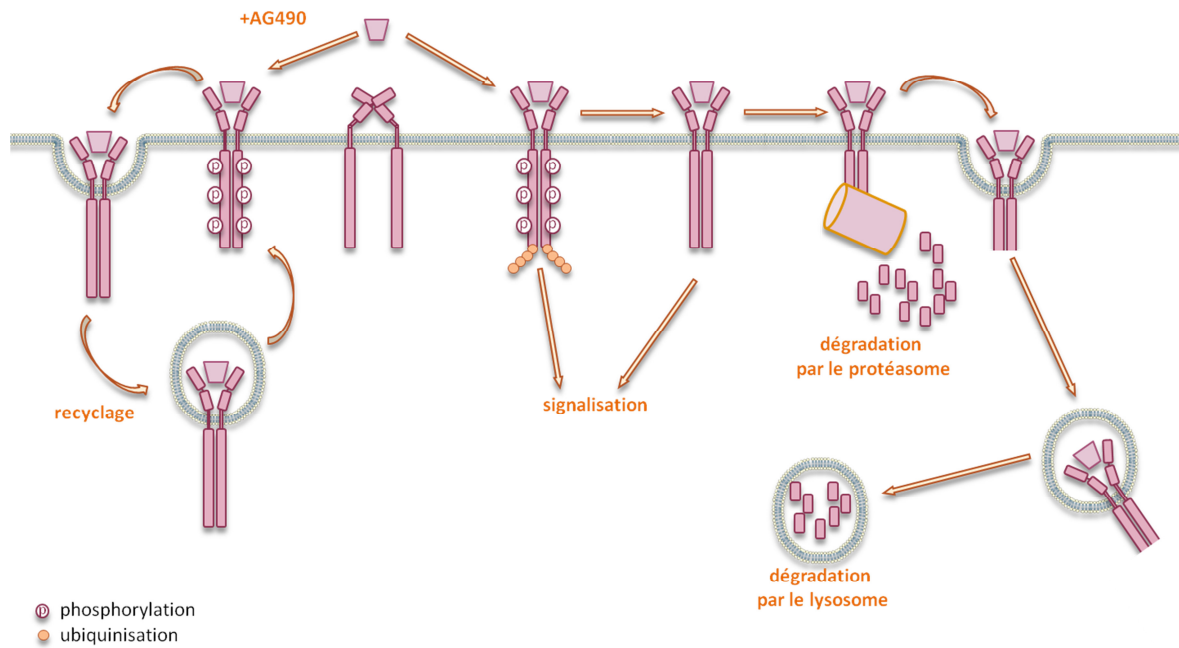


Figure 21 : Dégradation du récepteur de l'érythropoïétine via le protéasome et le lysosome

Une fois activé par son ligand, le récepteur de l'érythropoïétine va être poly-ubiquitinilé en partie C-terminal et partiellement dégradé par le protéasome. La partie non dégradée du récepteur ainsi que l'érythropoïétine liée à son domaine extracellulaire vont être en suite dégradé par le lysosome.

C. Synergie R-EPO / c-Kit dans l'érythropoïèse

Le SCF et l'EPO sont les deux cytokines majeures de la différenciation érythroïde. Le SCF est impliqué dans le maintien et la prolifération des cellules progénitrices et l'EPO joue un rôle important dans la protection des CFU-E et dans la différenciation terminale des érythroblastes.

Cependant, ces deux cytokines agissent en synergie. En effet, en 1995, Wu *et al.* a montré que des cellules dont la prolifération est dépendante de l'EPO (HCD57), mais qui expriment c-Kit à leur membrane, sont capables de survivre, et même de proliférer sous SCF uniquement. Afin de déterminer le rôle essentiel de ces deux récepteurs dans le phénomène observé, les auteurs utilisent des cellules exprimant de manière ectopique le R-EPO et c-Kit, et découvrent que la réponse au SCF ne peut se faire que par l'expression simultanée des deux récepteurs. Enfin, ils mènent des expériences de co-immunoprécipitation et prouvent l'interaction physique de ces deux protéines (Wu *et al.*, 1995b). De plus, il a été montré que

l'EPO induit la dimérisation et l'activation de c-Kit (Broudy *et al.*, 1998) et, inversement, que le SCF peut induire la phosphorylation du R-EPO (Jacobs-Helber *et al.*, 1997).

Les SFK (Src Family Kinase) sont essentielles à cette synergie. En effet, lorsque les tyrosines 568 et 570 de c-Kit (qui lient des membres de la famille des Src kinases) sont inactivées, c-Kit et R-EPO ne peuvent plus coopérer, alors que lorsque les tyrosines impliquées dans la signalisation PI3K sont mutées, les cellules ne présentent qu'une altération modeste de la synergie (Tan *et al.*, 2003). En 2002, Miller *et al.* a construit des mutants du R-EPO dépourvus de leur portion intracellulaire. Les analyses d'incorporation de ³H-thymidine, reflétant de manière quantitative la prolifération cellulaire, montrent que la synergie R-EPO/c-Kit est deux fois moins importante lorsque le récepteur ne peut signaler (Miller *et al.*, 2002).

Enfin, et d'un point de vue fonctionnel, l'implication de cette synergie apparaît essentielle, *in vivo*, au stade de la CFU-E ou même avant. En 1997, l'équipe de Lodish met en culture des progéniteurs érythroïdes issus de souris déficientes pour le gène codant le R-EPO et leur font exprimer de façon ectopique un R-EPO sauvage. Ces cellules, qu'elles aient été ou non en présence de SCF *in vivo*, ont besoin d'EPO et de SCF pour proliférer, alors que des progéniteurs érythroïdes issus des souris contrôles n'ont besoin que d'EPO (Wu *et al.*, 1997).

Bien que les arguments formels manquent, ces données suggèrent une interaction entre les récepteurs. Une altération de cette interaction pourrait réduire les capacités de différenciation des cellules érythroïdes.

IV. La biogenèse des ribosomes : une machinerie essentielle à l'érythropoïèse

Le ribosome est une machinerie complexe dédiée à la traduction des ARN messagers en protéines.

Afin de faire face à la production de 2.10^{11} globules rouges par jour, les érythroblastes ont constamment besoin de renouveler rapidement leur stock de protéines. Cependant, au cours des étapes tardives de maturation, ils synthétisent de moins en moins de protéines, jusqu'à l'arrêt total de toute néo-synthèse, précédant l'expulsion du noyau.

Ces observations suggèrent donc que la biogenèse des ribosomes pourrait jouer un rôle régulateur de la différenciation des érythroblastes.

A. Généralités sur la biogenèse du ribosome

Conservé au cours de l'évolution, le ribosome est une structure ribonucléoprotéique asymétrique composée d'une grande sous-unité 60S, et d'une petite sous-unité 40S.

La grande sous-unité 60S est composée de 49 protéines ribosomiques, appelées Rpl, pour Ribosomal protein large, et des ARN ribosomiques (ARNr) 28S, 5.8S et 5S. La petite sous-unité 40S est composée de 33 protéines ribosomiques, appelées Rps, pour Ribosomal protein small, et d'un seul ARNr, le 18S.

La maturation des ARNr et l'assemblage du ribosome se déroule principalement dans le nucléole (**Figure 22**).

Les ARNr 28S, 18S et 5.8S sont issus d'un long précurseur polycistronique appelé pré-47S, provenant d'ADNr transcrits par l'ARN polymérase I, alors que l'ARNr 5S est transcrit par l'ARN polymérase III.

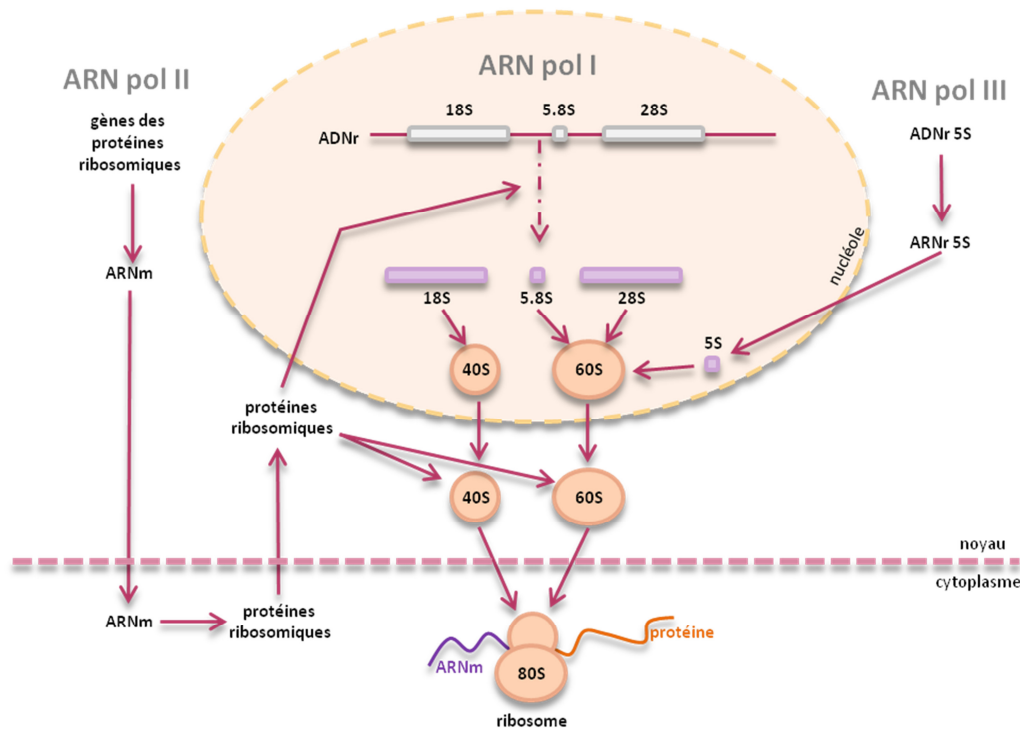


Figure 22 : Biogenèse des ribosomes

Le ribosome est composé d'une grande sous-unité 60S et d'une petite sous-unité 40S. La sous-unité 60S contient les ARNr 5.8S, 28S et 5S. La sous-unité 40S contient l'ARNr 18S. Une fois matures, les ARNr forment les deux sous-unités ribosomiques qui s'assembleront dans le cytoplasme.

La maturation des ARNr 28S, 18S et 5.8S est un processus complexe qui nécessite l'excision de domaines spécifiques de l'ARNr pré-47S, appelés ITS1 et 2 (Internal Transcribed Spacer) et ETS-5' et 3' (External Transcribed Spacer) (**Figure 23**).

Le premier clivage intervenant dans cette maturation a lieu au niveau du 5'-ETS du pré-47S, et donne naissance au pré-45S'. Celui-ci est ensuite clivé en ITS1, générant alors le pré-30S et le pré-32S. Le pré-30S est amputé de sa partie 5' puis de sa partie 3', donnant successivement naissance aux pré-21S, -18SE et enfin à l'ARNr mature 18S. Le pré-32S est quant à lui clivé au cœur de l'ITS2, générant ainsi l'ARNr mature 28S et le pré-12S, qui donnera l'ARNr mature 5.8S après excision de l'ITS2.

En 1993, Hadjiolova décrit une autre cinétique de maturation du pré-45S'. En effet, un clivage alternatif du pré-45S', au niveau du 5'-ETS et non de l'ITS1, donne naissance à un pré-41S, qui, une fois clivé dans l'ITS1, engendre les pré-30S et -32S (Hadjiolova *et al.*, 1993).

Il est à noter que ce clivage différentiel initiant les deux voies de maturation du pré-ARNr 45S' est aléatoire. Cependant, l'étude précise de la maturation des ARNr sur des cellules HeLa (lignée cellulaire de cancer de col de l'utérus, modèle type de l'étude des ribosomes) montre, qu'en conditions normales, les ARNr pré-30S et -32S sont plus accumulés que le pré-41S (O'Donohue *et al.*, 2010).

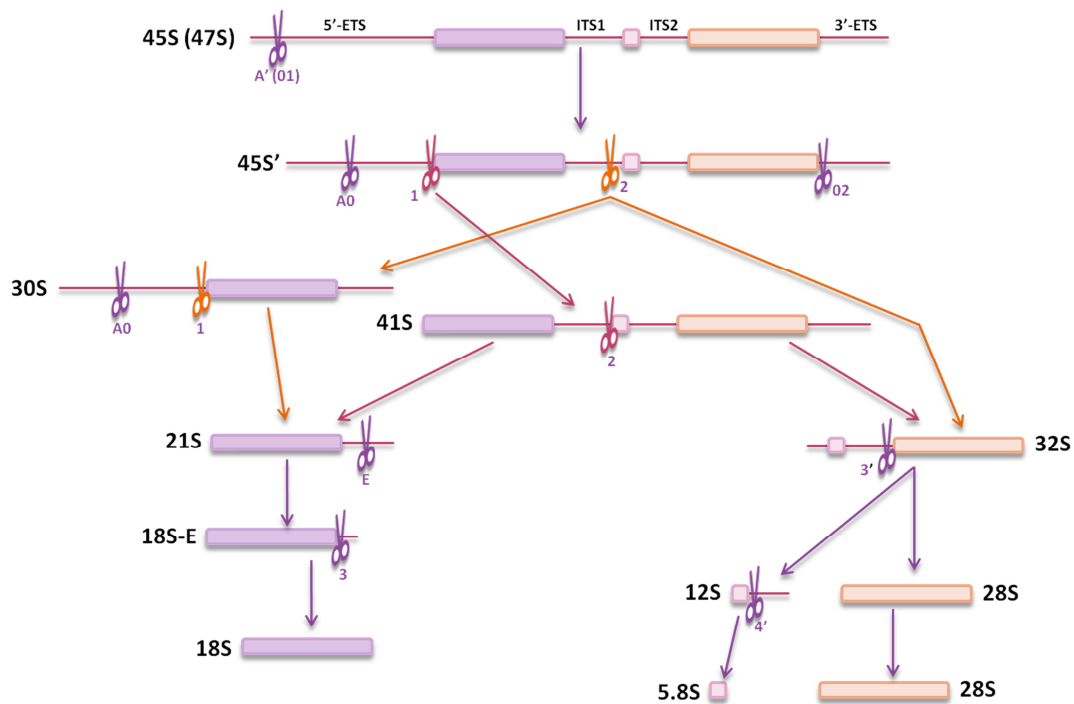


Figure 23 : Maturation des ARNr

La biogenèse du ribosome se déroule majoritairement dans le nucléole. La sous-unité 60S contient les ARNr 5.8S, 28S et 5S et la sous-unité 40S contient l'ARNr 18S. Les ARNr 28S, 18S et 5.8s sont issus de la transcription d'ADNr par l'ARN polymérase I, dans le nucléole, et l'ARNr 5S est transcrit par l'ARN polymérase II dans le noyau.

Les particules pré-60S et pré-40S sont ensuite exportées de manière active dans le cytoplasme (Gleizes *et al.*, 2001) et vont de nouveau subir des modifications, comme par exemple le clivage du pré-ARNr 18S-E, permettant la formation de l'ARNr mature 18S (Rouquette *et al.*, 2005) ainsi que la dissociation des protéines non ribosomiques impliquées dans l'assemblage et l'export nucléaire.

Une fois leur maturation achevée, les sous-unités 40S et 60S s'assemblent pour former un ribosome mature et ainsi permettre la synthèse protéique.

B. Conséquences d'un défaut de biogenèse des ribosomes en pathologie humaine

La découverte de mutations/délétions germinales touchant des gènes codant des protéines ribosomiques ou des régulateurs de la biogenèse des ribosomes, a contribué à la mise en évidence de ribosomopathies constitutionnelles ou acquises. Ces pathologies se caractérisent par l'association d'un syndrome malformatif et d'anomalies de la numération sanguine. La physiologie de ces pathologies souligne l'importance de la biogenèse des ribosomes dans l'érythropoïèse.

1. Ribosomopathies constitutionnelles

Le processus de maturation des ribosomes fait intervenir de nombreuses protéines non ribosomiques, et certaines ribosomopathies constitutionnelles sont la conséquence de mutations dans les gènes codant ces protéines régulatrices de la biogenèse du ribosome (**Figure 24**).

Parmi ces pathologies, le syndrome Schwachman-Diamond (SDS) se définit par des anomalies ou insuffisances hématopoïétiques, pancréatiques ou endocrines. De plus, les patients atteints de ce syndrome présentent des défauts de fonctionnement des lymphocytes T ainsi qu'une propension aux leucémies. En 2003, Boocock *et al.* montre que cette pathologie résulte d'une mutation bi-allélique touchant le gène codant la protéine SBDS (Shwachman-Bodian-Diamond Syndrome) (Boocock *et al.*, 2003). Cette protéine, localisée dans le nucléole (Austin *et al.*, 2005), est impliquée dans la maturation tardive de la sous-unité 60S du ribosome, ainsi que dans l'association des deux sous-unités (Burwick *et al.*, 2012).

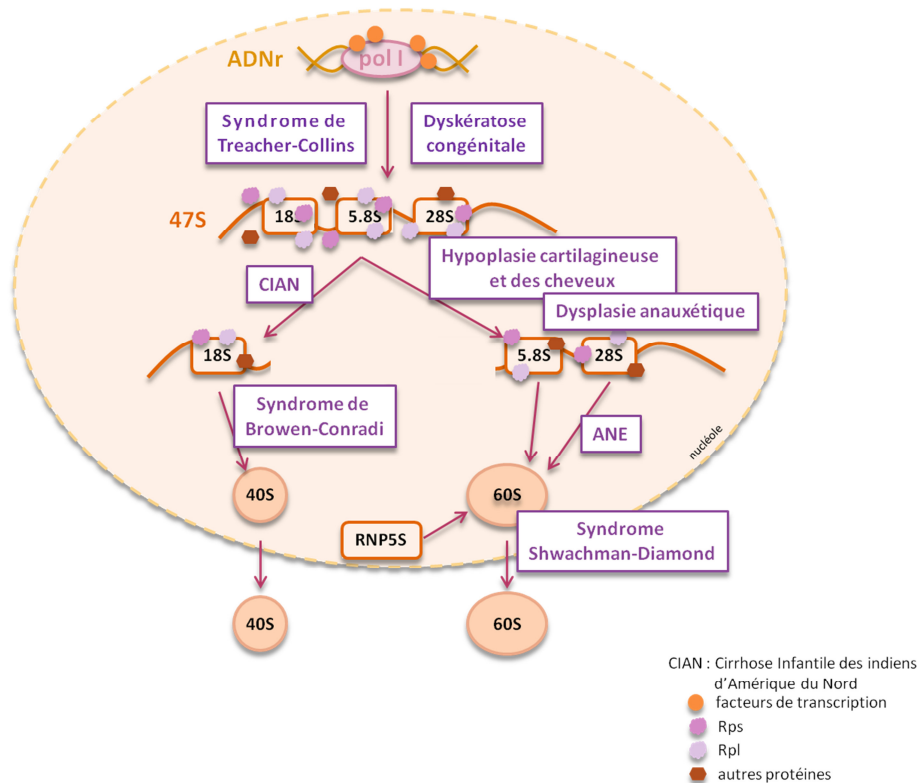


Figure 24 : Biogenèse des ribosomes et ribosomopathies associées

La biogenèse des ribosomes est un processus complexe faisant intervenir de nombreuses protéines ribosomiques et non ribosomiques. Les ribosomopathies sont des pathologies associées à un défaut de fonctionnement du ribosome. Celles-ci peuvent être la conséquence d'une délétion ou d'une mutation de gènes codant des protéines ribosomiques ou non ribosomiques, impliquées à n'importe quels stades de la maturation du ribosome. ● Facteurs de transcription ; ● Rps ; ● Rpl ; ● protéines non ribosomiques ; CIAN : Cirrhose Infantile de Indiens d'Amérique du Nord ; ANE : Syndrome d'Alopécie, de défauts Neurologiques et d'Endocrinopathie.

L'anémie de Blackfan-Diamond (ADB) est une anémie congénitale décrite en 1938. Cette pathologie rare (environ 4 à 5 cas pour 1.10^6 naissances) associe une anémie d'origine centrale, avec des anomalies crânio-faciales, cardiaques, des membres et du système urogénital, et une prédisposition accrue aux cancers (Vlachos *et al.*, 2008).

En 1999, Draptchinskaia *et al.* met en évidence la présence d'une mutation hétérozygote dans le gène codant la protéine Rps19, de la petite sous-unité 40S du ribosome (Draptchinskaia *et al.*, 1999). Depuis, de nombreuses autres mutations touchant des gènes codant des protéines de la grande ou de la petite sous-unité du ribosome ont été décrites. Parmi les protéines ribosomiques touchées, on retrouve Rpl11, Rpl5, Rpl35A, Rps24, Rps17,

Rps7, Rps26 ou encore Rps10 (Gazda *et al.*, 2006) (Cmejla *et al.*, 2007) (Farrar *et al.*, 2008) (Gazda *et al.*, 2008). Dans la majorité des cas, ces mutations aboutissent à une haploinsuffisance, correspondant à l'expression d'un seul allèle (Boria *et al.*, 2008).

Les mutations touchant des gènes codant des Rps induisent majoritairement un défaut de maturation des ARNr et d'assemblage des deux sous-unités du ribosome, alors que les mutations touchant des gènes codant des Rpl induisent une diminution de synthèse de la grande sous-unité, débouchant sur une réduction de la production de ribosomes.

A ce jour, il a été montré que la moitié des patients atteints d'ADB présente une mutation touchant un gène codant une protéine ribosomique. Parmi ces patients, 50% présentent une des 77 mutations décrites de Rps19. (Campagnoli *et al.*, 2008).

L'étude des anémies constitutionnelles a permis de comprendre la physiopathologie d'une anémie acquise, le syndrome 5q-.

2. Une ribosomopathie acquise : Le syndrome 5q-

Selon la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé de 2008, les syndromes 5q- sont un sous type de syndromes myélodysplasiques de faible risque. Cette pathologie touchant les femmes âgées, se caractérise par une hypoplasie érythroïde, liée à un défaut de différenciation et à un excès d'apoptose des érythroblastes, et par un faible risque de transformation en leucémie aigüe myéloïde (Vardiman *et al.*, 2002).

En 1974, Van den Berghe observe, chez cinq patients, un raccourcissement du bras long du chromosome 5. En 2002, Boulwood montre que ce raccourcissement correspond à la délétion de 40 gènes en position 5q33.1 (Boulwood *et al.*, 2002).

En 2008, Ebert *et al.* met en place une stratégie d'ARN interférence dirigée contre ces 40 gènes afin de déterminer quel(s) gène(s) est (sont) impliqué(s) dans la pathologie. Les résultats obtenus montrent que l'inhibition de l'expression de Rps14 mime les défauts hématopoïétiques retrouvés chez les patients, et que la surexpression de cette protéine dans des cellules de patients, restaure le phénotype érythroïde normal. Contrairement aux shARN contrôles, les shARN ciblant l'expression de Rps14 induisent une accumulation de

l'ARNr pré-30S, ainsi qu'une diminution de la sous-unité 40S et du ribosome mature (Ebert *et al.*, 2008). La même année, Pellagatti *et al.* montre que les patients atteints du syndrome 5q- ont une expression diminuée de moitié de Rps14 (Pellagatti *et al.*, 2008).

Enfin, McGowan *et al.* a mis en évidence une altération de l'expression de gènes codant des protéines ribosomiques de la petite ou de la grande sous-unité du ribosome, chez des patients porteurs de SMD de faible risque non 5q- (McGowan *et al.*, 2011).

Ces résultats suggèrent donc que les SMD pourraient également être la conséquence d'une altération de la maturation des ribosomes.

C. Conséquence d'un défaut de biogenèse des ribosomes : Activation de p53

1. La protéine p53 et sa régulation par HDM2

La protéine p53 est un facteur de transcription impliqué dans le contrôle de la réparation de l'ADN, du cycle cellulaire et de l'apoptose, d'où son nom de « gardien du génome » (Lane, 1992). Elle est stabilisée et activée en conditions de stress telles que l'hypoxie, les chimiothérapie ou encore le stress oxydatif (Levine and Oren, 2009).

HDM2 (Human Double Minute 2), et son orthologue murin MDM2 (Mouse Double Minute 2), est le principal régulateur négatif de p53.

Dans un premier temps, l'inhibition de p53 par HDM2 se déroule dans le compartiment nucléaire, où HDM2, en se fixant au domaine transactivateur de p53, bloque son rôle transcriptionnel tout en initiant son export (Gu *et al.*, 2001). Dans le cytoplasme, HDM2 joue un rôle d'ubiquitine E3-ligase, en induisant la polyubiquitinylation de p53, et par conséquent sa dégradation par le protéasome (Yang *et al.*, 2004).

La stabilisation de p53, en réponse à des signaux néfastes endogènes ou exogènes, peut être due à l'inhibition de la formation du complexe p53-HDM2, ou à sa dissociation après phosphorylation de p53 (Meek, 1999).

2. p53 et stress ribosomique

Le stress ribosomique, est la conséquence d'un défaut de biogenèse du ribosome, pouvant affecter la maturation des ARNr et/ou des particules pré-40S et pré-60S, ainsi que l'assemblage des sous-unités matures du ribosome.

De manière générale, lors d'un stress ribosomique, certaines protéines ribosomiques s'accumulent de manière anormale dans le cytoplasme. En se liant à HDM2, celles-ci empêchent la formation du complexe HDM2/p53, et induisent par conséquent la stabilisation de p53.

Rpl11 fut la première protéine ribosomique impliquée dans ce mécanisme moléculaire. En effet, en 2003, deux groupes montrent simultanément que Rpl11 peut se lier à HDM2, inhibant ainsi la formation du complexe HMD2/p53, et induisant par conséquent la stabilisation de p53 (Zhang *et al.*, 2003) (Lohrum *et al.*, 2003). Puis, il a été montré que l'expression à l'état hétérozygote des gènes codant les protéines Rps6, -s7 ou -s23, induit une accumulation anormale de Rpl11 dans le cytoplasme ainsi que l'activation de p53 (Fumagalli *et al.*, 2009) (Hölzel *et al.*, 2010). Depuis, il a été montré que Rpl23, -l5, -l27 et -s27 peuvent également se lier à HDM2 et induire la stabilisation de p53 (Jin *et al.*, 2004) (Dai and Lu, 2004) (Chen *et al.*, 2007) (Xiong *et al.*, 2011).

Cependant, la stabilisation de p53 peut également être indépendante de HDM2. En effet, il a été montré que Rps3 peut se lier directement à p53, bloquant ainsi sa dégradation (Yadavilli *et al.*, 2009). De plus, Rpl26 est capable de se fixer à la région 5'-UTR (UnTranslated Region) de l'ARNm de p53, augmentant ainsi son taux de traduction (Takagi *et al.*, 2005).

In vivo, le phénotype de poissons-zèbres déficients pour les gènes codant les protéines Rps7 et Rps19, associe des défauts hématopoïétiques et des retards de développement, comparables à la physiopathologie des patients atteints d'ADB, et imputables à une stabilisation de p53 (Duan *et al.*, 2011)

Dans un modèle de cellules hématopoïétiques immatures CD34⁺ humaines, Dutt *et al.* a montré que l'haploinsuffisance de Rps19, provoque un arrêt du cycle cellulaire en phase G0/1, dû l'accumulation et la stabilisation de p53 (Dutt *et al.*, 2011).

V. Erythropoïèse pathologique des syndromes myélodysplasiques de faible risque non 5q-

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés aux SMD avec dysérythropoïèse, incluant les syndromes 5q- et 80% des SMD non 5q-.

A. Définition et épidémiologie

Les SMD forment un groupe hétérogène de pathologies oligoclonales de la cellule souche hématopoïétique, se caractérisant par une hématopoïèse inefficace, aboutissant à des cytopénies périphériques, contrastant avec une moelle osseuse riche.

Ces pathologies touchent préférentiellement des sujets âgés (l'âge médian étant supérieur à 65 ans), avec une légère prédominance masculine (1.5 sujets masculins pour 1 sujet féminin). L'incidence des SMD est de 4 à 5 cas pour 100 000 habitants par an, chez des sujets âgés de moins de 70 ans, et de 70 à 80 cas pour 100 000 habitants par an chez des sujets de plus de 70 ans.

B. Classification et score de *pronostic*

Depuis 2008, la classification OMS a remplacé la classification FAB (pour French American British) décrite en 1982.

1. La classification OMS

Cette classification des syndromes myélodysplasiques, publiée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), prend en compte les caractères morphologiques et cytogénétiques des cellules hématopoïétiques, ainsi que le pourcentage de blastes dans la moelle osseuse (Vardiman *et al.*, 2009). Elle différencie les SMD de faible risque et les SMD de haut risque et ne prend pas en considération les Leucémies Myélo-Monocytaire Chroniques (LMMC) (**Tableau 1**).

Risque	OMS		% blaste (MO)	% sidéroblastes (MO)	dysplasie
Faible risque	Cytopénies réfractaires à dysplasie unilignée (CRDU)	Anémie Réfractaire (AR)	<5%	<15%	Une seule lignée
		Anémie réfractaire avec sidéroblastes en couronne (ASIA)	<5%	<15%	
		Neutropénie Réfractaire (NR)	<5%	<15%	
		Thrombopénie Réfractaire (TR)	<5%	<15%	
	Cytopénies réfractaires à dysplasie multilignée (CRDM)	CRDM sans sidéroblastes en couronne (CRDM-RS)	<5%	<15%	≥ 2 lignées
		CRDM avec sidéroblastes en couronne (CRDM+RS)	<5%	>15%	
	Syndromes 5q-		<5%	<15%	Anomalie 5q
	Anémie réfractaire avec excès de blastes de type 1 (AREB-1)		5 – 9%	<15%	Une ou plusieurs lignées
	Syndromes myélodysplasiques inclassables (MDS-U)		<5%	<15%	Une seule lignée
Haut risque	Anémie réfractaire avec excès de blastes de type 2 (AREB-2)		10 – 19%	<15%	Une ou plusieurs lignées
	Leucémie aiguë myéloïde secondaire (LAM)		>20%		

Tableau 1: Classification des syndromes myélodysplasiques (SMD) selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) de 2008

Parmi les SMD de faible risque, on distingue les cytopénies réfractaires à dysplasie unilignée (CRDU) ou multilignée (CRDM), les syndromes 5q- et les SMD inclassables (SMD-U), qui présentent tous un pourcentage de blastes dans la moelle inférieur à 5%. Les CRDU regroupent les anémies réfractaires (AR), les anémies réfractaires avec sidéroblastes en couronne (ASIA), les neutropénies réfractaires (NR) et les thrombopénies réfractaires (TR). Les CRDM sont subdivisées en deux sous-groupes, selon la présence (CRMD+RS) ou l'absence (CRMD-RS) de sidéroblastes en couronne. Les anémies réfractaires avec excès de blastes de type 1 (AREB-1), ayant un pourcentage de blastes dans la moelle osseuse, compris entre 5% et 9%, sont également considérées comme des SMD de faible risque.

Les anémies réfractaires avec excès de blastes de type 2 (AREB-2), comptant entre 10% et 19% de blastes dans la moelle et les LAM secondaires, avec plus de 20% de blastes dans la moelle, sont considérées comme des SMD de haut risque.

2. Epidémiologie, pronostic et score IPSS

Certains traitements anticancéreux, ou produits chimiques, précèdent parfois l'apparition d'un SMD, alors considéré comme secondaire. En effet, certains agents alkylants, comme le melphalan ou le cyclophosphamide peuvent augmenter de 100 fois les risques de développer un SMD (Pedersen-Bjergaard *et al.*, 2002). Des agents chimiques, comme le benzène ou des solvants organiques, paraissent également favoriser les SMD, ainsi que le tabagisme, l'obésité et certaines pathologies constitutionnelles comme la maladie de Fanconi (Ma *et al.*, 2009), (Mehta *et al.*, 2010).

La majorité des SMD sont primaires ou *de novo*, et 30% des patients porteurs d'un SMD développent une LAM secondaire.

Le score IPSS-R (International Prognostic Scoring System-Revised) permet de déterminer le risque évolutif de la pathologie et de prédire la survie des patients, selon 5 catégories (**Tableau 2**). Ce score prend en compte le pourcentage de blastes dans la moelle osseuse, le caryotype et le nombre de cytopénies périphériques (Hb<10g/dL, poly-neutro<1.8G/L ou plaquette < 100G/L) (Schanz *et al.*, 2011) (Greenberg *et al.*, 2012).

Des anomalies cytogénétiques sont observées chez 50% des patients. En effet, 20% des patients porteurs d'un SMD présentent des anomalies del(5q), 15% une monosomie 7 ou une del(7q), 10-15% ont une trisomie 8, et dans 10% des cas une del(Y).

Le caryotype peut également être « complexe ».

Risk Score	Cytogenetic abnormalities	BM blast %	IPSS-R groups	Risk score	Survival (years)
0	-Y, del(11q)	≤ 2%	Very low	≤ 1.5	8.8
1	Normal, del(5q), del(12q), del(20q), double including del(5q)	2-5%	Low	> 1.5-3	5.3
2	del(7q), +8, +19, i(17q), any another single or double independent clones	5-10%	Intermediate	> 3-4.5	3.0
3	-7, inv(3)/t(3q)/del(3q), double including -7/del(7q), complex: 3 abnormalities	>10%	High	> 4.5-6	1.6
4	Complex: >3 abnormalities		Very high	> 6	0.8

cytogénétique	Very good 0	Good 1	Int 4	Poor 6	Very poor 8
% blastés médullaires	<5 0	5-10 2	11-20 4	21-30 6	
Hb	>10 0	<10 2			
ANC	>0.8 0	<0.8 1			
plaquettes	>100 0	<100 1			

Tableau 2 : Score IPSS-R des syndromes myélodysplasiques (SMD) (d'après Greenberg et al., 2012)

C. Physiopathologie des SMD

La physiopathologie des SMD n'est pas encore bien connue. De façon générale, l'apparition d'un SMD peut s'expliquer par des anomalies de l'environnement médullaire ou par des anomalies intrinsèques de la CSH, conduisant à un défaut de prolifération et à un excès d'apoptose des érythroblastes.

1. Anomalies clonales de la cellule souche hématopoïétique :

C'est en 1989, *via* des études d'inactivation du chromosome X, que le caractère clonal des SMD a été mis en évidence (Janssen *et al.*, 1989). Au début des années 2000, deux études portant sur des patients porteurs d'un SMD ayant une del(5q) ou une trisomie 8, mettent en évidence une anomalie clonale de la CSH, se traduisant par des défauts de prolifération, de survie et de différenciation (Nilsson *et al.*, 2002)(Nilsson *et al.*, 2000).

Sur le plan fonctionnel, les cultures à long terme de type LTC-IC de progéniteurs issus de patients myélodysplasiques ou de sujets contrôles, ont montré que la CSH pathologique perd ses capacités d'auto-renouvellement (Sato *et al.*, 1998).

Le caractère oligoclonal de la pathologie a récemment été démontré *via* des techniques de séquençages nouvelle génération. Aux stades précoces de la maladie, les patients présentent deux clones moléculaires différents alors qu'au stade de transformation en LAM secondaire, trois clones peuvent être détectés. Ces clones pathologiques peuvent présenter une ou plusieurs mutations. Parmi les gènes régulièrement mutés, les gènes TET2, ASXL1 ou encore IDH1/2, qui codent pour des régulateurs épigénétiques de la transcription, confèrent à la CSH un avantage sélectif et contribue à la dérégulation de l'hématopoïèse. D'autres mutations fréquemment retrouvées chez les patients porteurs d'un SMD touchent des gènes du spliceosome, comme par exemple SF3B1, SRSF2 ou encore ZRSR2. Ces mutations semblent contribuer à la modification du phénotype pathologique. Par exemple, les mutations affectant le gène SF3B1, sont pratiquement toujours associées à la présence de sidéroblastes en couronne (pour revue, Raza and Galili, 2012).

2. Apoptose des progéniteurs médullaires

En 1995, l'étude de biopsies médullaires issues de patients atteints de SMD, montre pour la première fois une apoptose massive des précurseurs hématopoïétiques (Raza *et al.*, 1995). Depuis, de nombreux travaux ont porté sur le sujet, et plusieurs voies de signalisation sont aujourd'hui impliquées, comme par exemple la signalisation Fas/Fas-L.

En effet, il a été montré que l'expression anormale du récepteur Fas dès le début de la différenciation érythroïde, est corrélée avec une augmentation de l'apoptose des érythroblastes matures, qui expriment Fas-L (Claessens *et al.*, 2002). En revanche, l'expression ectopique d'un dominant négatif de la protéine adaptatrice de Fas, FADD (Fas-Associated protein with Death Domain), dans des érythroblastes immatures issus de patients atteints de SMD, permet de restaurer 50% du phénotype apoptotique des cellules, tout en facilitant leurs croissance, sans perturber leur différenciation (Claessens *et al.*, 2005) (**Figure 25**).

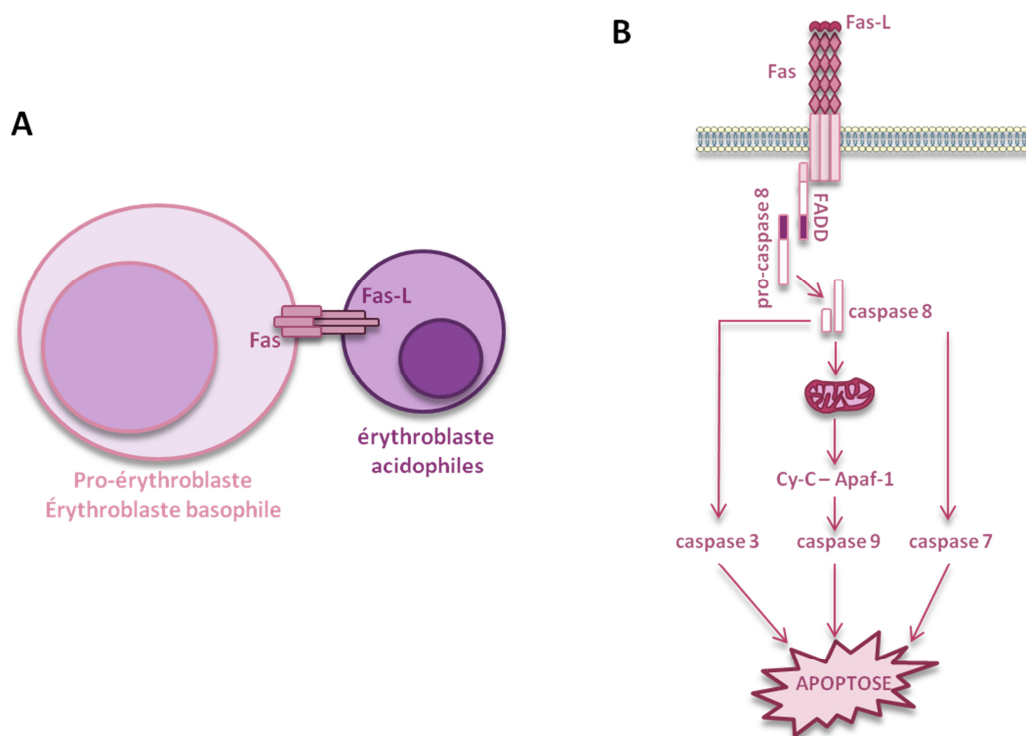


Figure 25 : Schéma de l'apoptose médiée par Fas/Fas-L des cellules érythroïdes

A. Les érythroblastes acidophiles expriment Fas-L à leur surface, qui interagit avec son récepteur Fas exprimé par les proérythroblastes ou les érythroblastes basophiles. **B.** La fixation de Fas-L à son récepteur Fas induit sa trimérisation et le recrutement de FADD et de la pro-caspase 8. Ce complexe aboutit à l'activation de la caspase 8 et à l'activation des caspases effectrices 3 et 7, ou de la caspase 9 *via* la voie mitochondriale, mettant en jeu le cytochrome C et Apaf-1.

Les protéines de la famille Bcl-2 (comprenant des membres pro-apoptotiques, tels que Bax, Bad, Bak, Bik, Bid et Bcl-Xs, et des membres anti-apoptotiques, tels que Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1) jouent également un rôle important dans l'apoptose des précurseurs érythroïdes des patients atteints de SMD. En effet, à des stades précoces de la maladie, la quantité de protéines pro-apoptotiques, telles que Bax et Bad, augmente au détriment de la quantité de protéines anti-apoptotiques, telles que Bcl-2 et Bcl-xL (Parker *et al.*, 1998).

3. Défaut de différenciation érythroïde

Une des caractéristiques communes des SMD de faible risque avec dysérythropoïèse, est le défaut d'expression de marqueurs érythroïdes tel que la glycophorine A (GPA -

CD235a). Récemment, il a été montré que cette anomalie est liée au clivage prématuré du facteur de transcription érythroïde GATA-1, par les caspases. En effet, dans les érythroblastes normaux en fin de différenciation, la protéine de choc thermique Hsp70 est relocalisée dans le noyau et protège GATA-1 du clivage. En condition pathologique, Hsp70 n'est pas relocalisée dans le noyau, GATA-1 est donc clivé et ne peut alors plus assurer la transcription de gènes érythroïdes, nécessaires à la différenciation terminale. (Frisan *et al.*, 2012) (**Figure 26**).

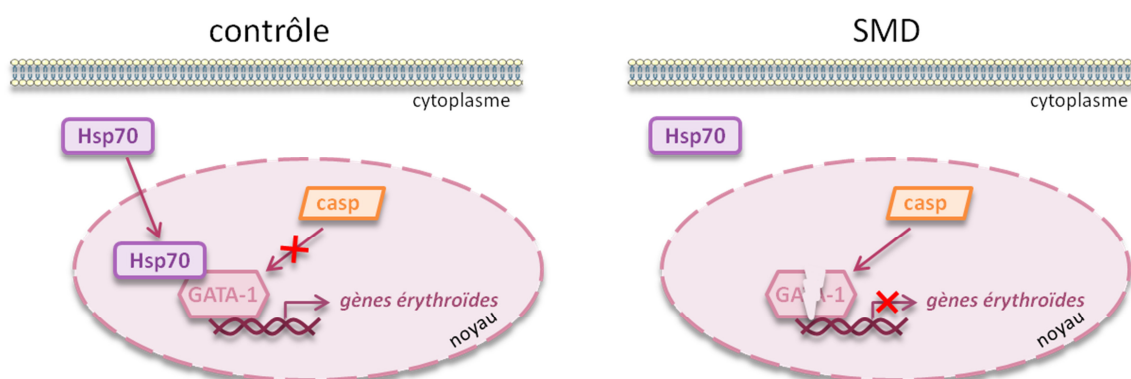


Figure 26 : Défaut de relocalisation d'Hsp70 dans les SMD et clivage de GATA-1

En fin de différenciation érythroïde, Hsp70 est normalement relocalisée dans le noyau et protège GATA-1 du clivage par les caspases. En cas de SMD, Hsp70 n'est plus relocalisée, GATA-1 est clivé et n'assure plus la transcription de gènes nécessaires à la différenciation érythroïde.

4. Implication des cytokines régulatrices de l'érythropoïèse dans la physiopathologie des SMD

a) EPO/R-EPO

La dysplasie observée chez les patients atteints de SMD ne semble pas être corrélée à un défaut de signalisation en aval du récepteur de l'érythropoïétine. En effet, en 1996, deux groupes ont montré qu'à la surface des progéniteurs érythroïdes issus de patients porteurs d'un SMD de faible risque, le récepteur de l'érythropoïétine est correctement exprimé (Backx *et al.*, 1996) et qu'il ne présente aucune mutation (Mittelman *et al.*, 1996). Des études menées sur des érythroblastes cultivés ont montré que la phosphorylation d'Akt et

de Erk1/2 est comparable chez les patients et chez les témoins, ainsi que la phosphorylation du facteur de transcription Foxo3A. (Claessens *et al.*, 2002). En revanche, des analyses sur des moelles totales fraîches ont permis de mettre en évidence une altération de la phosphorylation de Erk1/2 chez des patients porteurs d'un SMD et résistants à l'EPO (Frisan *et al.*, 2010) (Spinelli *et al.*, 2012).

b) SCF/c-Kit

L'implication du SCF et de son récepteur c-Kit dans la physiopathologie des SMD n'est à ce jour pas encore établie.

En effet, même si le taux de SCF circulant est identique chez les patients et chez les sujets sains (Cortelezzi *et al.*, 1999), il a été suggéré que l'expression de c-Kit est augmentée à la surface des progéniteurs CD34⁺ de SMD comparativement aux progéniteurs normaux (Maynadié *et al.*, 2002). De même, des analyses réalisées au laboratoire ont mis en évidence que dans 30% des cas, c-Kit persiste à la membrane des érythroblastes en différenciation alors qu'en condition normale, son expression est perdue au fur et à mesure de la maturation érythroïde. Enfin, très récemment, il a été montré que les souris déficientes pour le gène codant la protéine Smad1, impliquée dans le processus d'endocytose *via* les puits de clathrine, ont une accumulation intracellulaire anormale de c-Kit et développent avec l'âge une anémie associée à une dysplasie médullaire comparable à un SMD (Kon *et al.*, 2013).

Ces résultats suggèrent donc un rôle pour l'expression ectopique de c-Kit dans l'apparition d'un SMD.

Résultats I

Impact de l'imatinib sur le récepteur au SCF,
c-Kit

Article publié

**Tyrosine Kinase Inhibitors Induce Down-Regulation of c-Kit
by Targeting the ATP Pocket**

d'Allard D*, Gay J*, Descarpentries C, Frisan E, Adam K, Verdier F, Floquet C,
Dubreuil P, Lacombe C, Fontenay M, Mayeux P, Kosmider O.

PlosOne 2013, 23;8(4):e60961

I. Contexte scientifique

Chez l'Homme, de nombreuses pathologies sont associées à une activité anormale de c-Kit. Dans le cas de pathologies associées à une activation constitutive de c-Kit, le traitement est basé sur l'utilisation d'agents pharmacologiques à titre d'inhibiteur de tyrosine kinase. L'exemple de l'imatinib sera développé ci-après.

Au cours de cette partie de mon travail de thèse, nous nous sommes intéressés à l'impact de l'imatinib sur un récepteur c-Kit sauvage, non activé par son ligand le SCF, dans un contexte de cellules érythroïdes.

A. c-Kit et pathologies

Des modulations de la signalisation en aval de c-Kit sont impliquées dans de nombreuses pathologies. Ces anomalies de signalisation peuvent être le résultat de différents mécanismes, comme l'apparition de boucles de régulation autocrine de production de SCF ou la présence de mutations génétiques (activatrices ou inhibitrices) touchant la séquence nucléotidique du récepteur c-Kit lui-même.

1. Boucle d'activation autocrine

L'activation non contrôlée de la signalisation en aval du récepteur c-Kit peut être due à une boucle autocrine d'activation, résultant d'une augmentation de production de SCF, associée ou non à une augmentation de l'expression de c-Kit. Par exemple, 70% des cas de carcinome pulmonaire à petites cellules (SCLC) présentent une expression importante et concomitante de c-Kit et du SCF (Hibi *et al.*, 1991), qui contribue fortement à la prolifération des cellules malignes (Krystal *et al.*, 1996).

De façon moins fréquente, cette boucle d'activation autocrine est retrouvée dans des cancers cervicaux (Martinho *et al.*, 2008), des cancers du sein (Théou-Anton *et al.*, 2006) et dans certains cas de cancers gastro-intestinaux (GIST ; pour GastroIntestinal Stromal Tumor)

(Hines *et al.*, 1999). Cependant, la majorité des cas de GIST arbore des mutations activatrices acquises du gène codant c-Kit. Ceci sera développé dans un chapitre ultérieur.

2. Mutations inhibitrices de c-Kit

Les pathologies associées à des mutations inhibitrices de c-Kit sont peu fréquentes. Le piebaldisme est une pathologie bénigne rare, se caractérisant par des défauts de pigmentation au niveau du tronc et des cheveux, résultant de l'absence de mélanocytes. Depuis quelques années, différentes anomalies de c-Kit ont été associées à ce phénotype, comme par exemple les mutations missense T1859C (Deng *et al.*, 2005) et T619A ainsi que la duplication T437dup (Wasag *et al.*, 2012), touchant respectivement le TKD et l'ECD du récepteur.

Toutes ces altérations du gène codant c-Kit semblent aboutir à un blocage de la signalisation en aval du récepteur.

3. Mutations activatrices de c-Kit

Les mutations activatrices de c-Kit sont les altérations oncogéniques les plus fréquentes, et peuvent toucher différents domaines du récepteur (**Figure 27**).

a) *Mutations du domaine extracellulaire, exemple des LAM à CBF*

Les Leucémies Aigües Myéloblastiques (LAM) à Core Binding Factor (CBF) sont un sous type de LAM caractérisées par une translocation t(8;21) ou une anomalie du chromosome 16 à titre d'inversion ou de translocation.

Dans le cadre de patients porteurs d'une translocation t(8;21), il y a synthèse d'une protéine de fusion AML1-ETO qui agit comme un répresseur transcriptionnel (Nucifora and Rowley, 1994) (Downing, 1999). Dans les cas présentant une anomalie du chromosome 16, le gène codant pour le facteur de transcription *CBFβ* fusionne avec le gène *MYH11*. La

protéine de fusion CBF β -MYH₁₁ ainsi générée inhibe la différenciation myéloïde *via* la séquestration de CBF β dans le cytoplasme (Hiebert *et al.*, 2001).

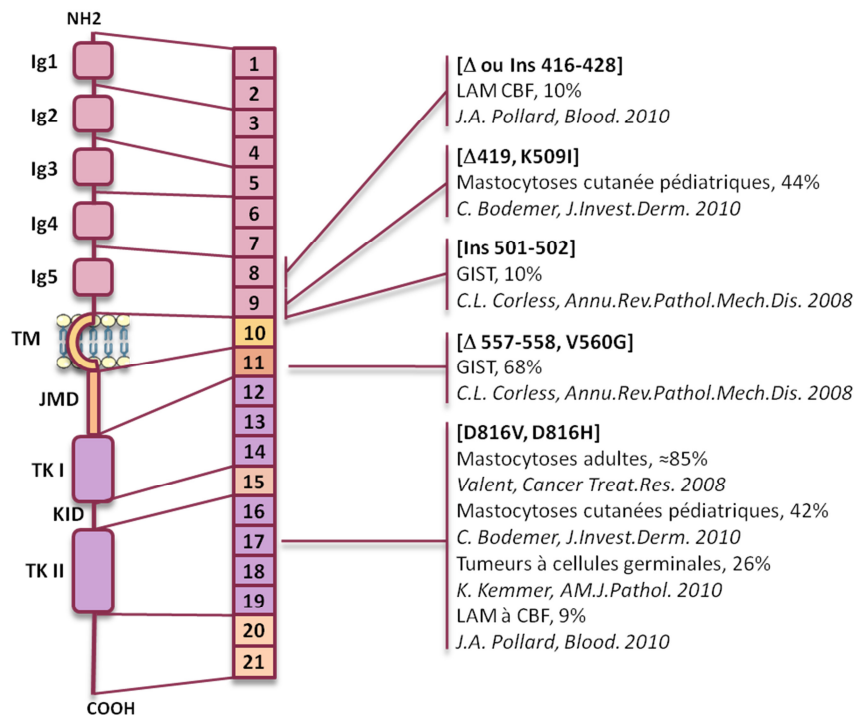


Figure 27 : Mutations activatrices de c-Kit fréquemment retrouvées en pathologie humaine
Schéma du récepteur présentant la localisation des principales mutations retrouvées en pathologie humaine. Les % représentent le pourcentage de patients porteurs de la mutation parmi les cohortes étudiées.

En association avec ces anomalies touchant des facteurs de transcription et bloquant ainsi le processus de différenciation, environ 50% des patients porteurs d'une LAM à CBF présentent des mutations activatrices du récepteur c-Kit. Parmi l'ensemble des LAM, ce sous type est associé à un pronostic dit « favorable », mais lorsque c-Kit est muté, ce pronostic devient défavorable et le nombre de rechutes est significativement augmenté (Boissel *et al.*, 2006) (Pollard *et al.*, 2010).

Les mutations de l'exon 8 de c-Kit (impliquant une insertion ou une délétion des acides amnés 416 à 428) sont principalement retrouvées dans les LAM à CBF avec une inversion du chromosome 16. En 2005, Kohl *et al.* étudie l'impact de ces mutations, en

utilisant des cellules murines exprimant de façon ectopique des mutants de l'exon 8. Les résultats obtenus montrent que les récepteurs c-Kit porteurs de ces mutations sont constitutivement actifs, soutiennent la prolifération cellulaire *via* la phosphorylation constitutive des MAPK, et sont associés à un phénomène de résistance à l'apoptose. Des inhibiteurs pharmacologiques de la PI3K ou de Mek1 (respectivement LY294002 et PD98059) inhibent, dans ce système, la prolifération cellulaire dépendante du récepteur muté (Kohl *et al.*, 2005).

Ces résultats suggèrent donc que ces mutations ont un effet pro-prolifératif, dû à l'activation de voies de signalisation en aval du récepteur, et sont directement impliquées dans le mauvais pronostic des LAM à CBF avec mutation de c-Kit.

De manière plus rare, 9 % des cas de LAM à CBF présentent une mutation activatrice du récepteur, touchant un résidu de l'exon 17, codant pour une partie du domaine intracellulaire de c-Kit.

b) Mutations du domaine juxtamembranaire, exemple des GIST

Les GIST sont des tumeurs solides mésenchymateuses, localisées au niveau de la paroi du tube digestif et pouvant s'étendre jusqu'à l'abdomen, avec possibilité de dissémination hépatique sous forme de métastases.

C'est en 1998, que le groupe de Kitamura met en évidence des mutations « gain de fonction » de c-Kit dans les cellules interstitielles de Cajal, chez des patient atteints de GIST. Dans ces travaux, l'équipe a étudié, en immuno-histochimie, l'expression de c-Kit sur des coupes de tissus et a montré que 94% des patients l'expriment fortement. Suite à cette analyse, des échantillons d'ADNc, issus de matériel provenant des tumeurs de patients, ont été isolés et transfectés de façon stable dans des cellules murines. Les résultats obtenus ont montré que ces mutations de c-Kit sont associées à un récepteur constitutivement actif capable de soutenir la prolifération cellulaire, en absence de son ligand. De plus, les souris nude ayant été greffées avec ces cellules transfectées présentent une croissance tumorale

statistiquement augmentée en comparaison aux souris contrôles, greffées avec des cellules non infectées ou infectées avec la forme sauvage de c-Kit (Hirota *et al.*, 1998).

Parmi les patients porteurs de GIST, les mutations de c-Kit sont hétérogènes. En effet, 68% des patients présentent une mutation dans l'exon 11, 10% dans l'exon 9 et 1% dans les exons 13 ou 17. Néanmoins, chez 8% des patients, aucune mutation de c-Kit n'a pu être mise en évidence (Corless and Heinrich, 2008).

De manière intéressante, lorsque c-Kit présente une mutation missense V560G, située dans l'exon 9, son JMD n'interagit plus avec son TKD, ce qui a pour conséquence l'ouverture constitutive de la poche catalytique du récepteur (Mol *et al.*, 2003b).

En 2004, Duensing *et al.* a analysé la signalisation en aval de c-Kit sur des cellules primaires issues de patients atteints de GIST, ainsi que sur des lignées cellulaires présentant des mutations activatrices du récepteur. *Via* des analyses de phosphorylation en Western-Blot, les auteurs ont pu montrer une variation d'expression et d'activation de c-Kit chez les patients, ainsi qu'une sensibilité au SCF, lorsque la mutation est présente à l'état hétérozygote. Il apparaît également que la phosphorylation de la sérine/thréonine kinase Akt soit reliée à l'expression de marqueurs de prolifération tels que PCNA (Prolifering Cell Nuclear Antigen) ou la cycline A. Ceci suggère donc que la signalisation médiée par Akt, dépendante de c-Kit, est associée au pouvoir pro-prolifératif des cellules tumorales (Duensing *et al.*, 2004). De façon intéressante, aucun patient ni lignée cellulaire ne présente la phosphorylation activatrice du résidu tyrosine 694 du facteur de transcription STAT5. Ceci suggère donc que les acteurs impliqués dans la signalisation de STAT5 en aval de c-Kit ne sont pas mis en jeu dans ce contexte pathologique.

En 2002, Frost *et al.* étudie la signalisation en aval du mutant de c-Kit V560G dans un modèle de cellules hématopoïétiques. Les résultats obtenus ne révèlent aucune phosphorylation d'Erk1/2 et d'Akt (Frost *et al.*, 2002), alors que les résultats de l'étude de Duensing *et al.* montrent une activation par phosphorylation de ces deux protéines (Duensing *et al.*, 2004).

La signalisation en aval d'un même récepteur mutant constitutivement actif, dépend donc du contexte cellulaire, et semble variable d'un individu à l'autre. Mais des variations techniques sont également envisageables.

Néanmoins, tous les patients atteints de GIST n'arborent pas de mutations touchant le gène codant c-Kit. Parmi ceux-ci 5% à 8% présentent une mutation du récepteur à activité tyrosine kinase de classe III, PDGFR α , qui lui confère également une activité constitutive.

Il est à noter que les mutations activatrices de c-Kit et de PDGFR α sont mutuellement exclusives les unes des autres (Corless et al., 2011).

c) Mutations du domaine intracellulaire, exemple de la mastocytose systémique

Les mastocytoses forment un groupe hétérogène de pathologies caractérisées par une prolifération et une accumulation anormale de mastocytes dans divers organes (Valent *et al.*, 2012). On distingue les mastocytoses pédiatriques, la plupart du temps bénignes, et les mastocytoses systémiques de l'adulte, malignes et agressives.

A partir de biopsies de patients adultes atteints de mastocytose, Longley *et al.* identifie une mutation activatrice de c-Kit, localisée au niveau du domaine intracellulaire du récepteur (Longley *et al.*, 1999). Dans la majorité des cas, cette mutation résulte de la substitution de l'aspartate, en position 816, en valine (D816V) (Valent, 2008) (Lim *et al.*, 2009). Il existe également d'autres mutations touchant ce résidu aspartate 816, comme les mutations D816Y et D816F. Ces mutations confèrent au récepteur une activité kinase constitutive, *via* l'altération permanente de sa conformation.

En 2001, Chian *et al.* étudie en Western Blot la signalisation en aval de mutants D816 de c-Kit et montre qu'il existe une activation constitutive de la PI3K (Chian *et al.*, 2001). De façon paradoxale, cette équipe ne met en évidence aucune phosphorylation de la sérine/thréonine kinase Akt, alors que son activation dans des cellules primaires de patients porteurs de la mutation D816V et atteints de mastocytose, a pu clairement être démontrée par d'autres équipes (Gabillot-Carré *et al.*, 2006). Les effets anti-prolifératifs d'inhibiteurs spécifiques de la PI3K (wortamine ou LY249002) ou de mTOR (rapamycin) utilisés dans ces

deux études semblent montrer que le pouvoir prolifératif des cellules exprimant un mutant D816 de c-Kit, est dû à la signalisation en aval de la PI3K.

De plus, il a été montré que la protéine kinase FES est le principal effecteur de la prolifération des cellules érythroleucémiques humaines TF-1, exprimant de manière ectopique le mutant D816V de c-Kit, ainsi que des mastocytes issus de souris P-815, présentant la mutation D814Y (mutation murine homologue de la mutation humaine D816V) (Voisset *et al.*, 2007). Il est à noter que FES peut se lier à la forme sauvage de c-Kit lorsque celui-ci est activé par son ligand. Cependant, et contrairement à la forme mutée D816V, cette interaction ne soutient pas la prolifération des cellules, mais participe à un processus de migration, pouvant être assimilé au processus d'envahissement tumoral (Voisset *et al.*, 2010).

En conditions normales, la stimulation de c-Kit par son ligand induit une activation modérée de STAT3. Lorsque c-Kit présente une mutation D816, cette signalisation est fortement augmentée et soutient une prolifération spontanée (Ning *et al.*, 2001a, 2001b). Dans ce contexte, STAT5 est également fortement activé et retrouvé dans le cytoplasme, où il interagit avec la protéine adaptatrice Gab2 et la sous-unité catalytique p85 de la PI3K. Ces résultats impliquent donc un axe de signalisation oncogénique c-Kit D816/STAT5/PI3K/Akt, qui soutient la prolifération des cellules tumorales (Harir *et al.*, 2007, 2008) (Baumgartner *et al.*, 2009).

Cependant, il apparaît que la mutation D816V confère au récepteur c-Kit un pouvoir oncogénique modéré. Une étude a récemment mis en évidence une régulation négative de ce mutant par les tyrosines 568 et 570, situé au niveau du JMD du récepteur. En effet, lorsque ce mutant présente une substitution des résidus tyrosines 568 et 570 en phénylalanines, la croissance cellulaire en milieu semi-solide est renforcée ainsi que sa capacité à induire des leucémies lorsque les cellules sont injectées à des souris nude (Chaix *et al.*, 2013).

B. c-Kit et thérapeutique : les inhibiteurs de tyrosine kinase

Depuis plus de quinze ans, l'industrie pharmaceutique a développé de nombreuses molécules inhibant la signalisation intracellulaire, à l'origine de la prolifération incontrôlée et de la survie des cellules tumorales, impliquées dans de nombreux modèles de cancer.

1. Généralités sur les inhibiteurs de tyrosine kinase

Les protéines à activités tyrosine kinase jouent un rôle majeur dans la signalisation intracellulaire. Elles assurent le transfert d'un groupement phosphate de l'adénosine triphosphate (ATP), qui se fixe à leurs proches catalytiques, vers les protéines effectrices. En cas de mutations activatrices, ces tyrosines kinases ont une activité aberrante qui aboutit le plus souvent à l'initiation incontrôlée de voies de signalisation, conduisant à des phénotypes tumoraux (Figure 28).

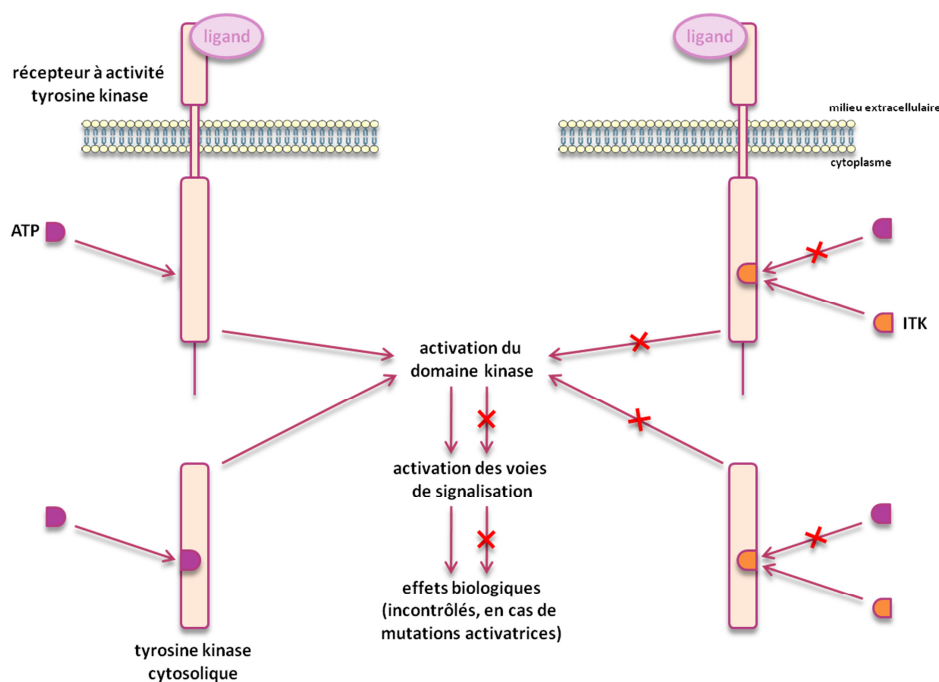


Figure 28 : Mode schématique d'action des inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK)

En se fixant à la poche catalytique d'une protéine à activité kinase, l'ATP initie la transduction du signal. Les inhibiteurs de tyrosine kinase rentrent en compétition avec l'ATP afin d'inhiber l'activation de cette signalisation en aval.

Les inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) sont de petits composés chimiques qui rentrent en compétition avec l'ATP et se fixent à la poche catalytique de la protéine, bloquant ainsi sa signalisation.

Au cours de ce travail, nous avons étudié l'imatinib, un ITK issu des premiers développements de l'industrie pharmaceutique.

2. L'imatinib

a) *Description*

La Leucémie Myéloïde Chronique (LMC) est une hémopathie maligne caractérisée par la production excessive de cellules granuleuses et par leur persistance dans la moelle osseuse.

Les patients atteints de LMC présentent une anomalie chromosomique, résultant de la fusion d'une partie du gène codant la protéine kinase Abelson (Abl), situé sur le chromosome 9, et une partie du gène codant la protéine Break-Cluster Region (BCR), situé sur le chromosome 22. Cette protéine de fusion, nommée BCR-Abl, est associée à une activation constitutive de la kinase Abl, qui est à l'origine de la prolifération massive des leucocytes.

C'est en 1992 que la société pharmacologique Ciba-Geigy (actuelle Novartis®) met au point un inhibiteur spécifique de cette protéine de fusion, le STI-571 (Signal Transduction Inhibitor - 571 ; aussi appelé imatinib, imatinib mésylate, Gleevec®, ou Glivec®), dérivé du 2-phényl-pyrimidine (**Figure 29**).

Depuis ses premières utilisations, ce composé est toujours le traitement de référence de la LMC.

Cependant, et comme de nombreux ITK, l'imatinib n'est pas spécifique de BCR-Abl, et inhibe également d'autres protéines à activité tyrosine kinase, telles que c-Kit (Heinrich *et al.*, 2000) et PDGFR (Buchdunger *et al.*, 2000).

b) c-Kit et imatinib

En 2001, le Dr George Demetri teste avec succès l'imatinib sur une patiente finlandaise atteinte de GIST avec une mutation V560G de c-Kit (Joensuu *et al.*, 2001) (Demetri *et al.*, 2002).

En condition normale, sans SCF, le récepteur c-Kit est dans une conformation auto-inhibée. Celle-ci se traduit par l'interaction de son JMD avec son TKD, bloquant ainsi l'accès à la poche catalytique. Lorsque c-Kit est stimulé par son ligand, le JMD n'interagit plus avec le TKD, libérant alors l'accès à la poche catalytique (Mol *et al.*, 2003b).

L'étude cristallographique du complexe formé par le récepteur c-Kit sauvage et l'imatinib, montre que ce dernier vient se loger dans la poche catalytique de c-Kit quand celui-ci est sous sa conformation inactive. En créant des ponts hydrogènes avec la cystéine 673, la thréonine 670 et l'asparagine 810, l'imatinib induit un mouvement du JMD et crée sa rupture avec le TKD, permettant alors le libre accès à la poche catalytique (Mol *et al.*, 2004) (Figure 29).

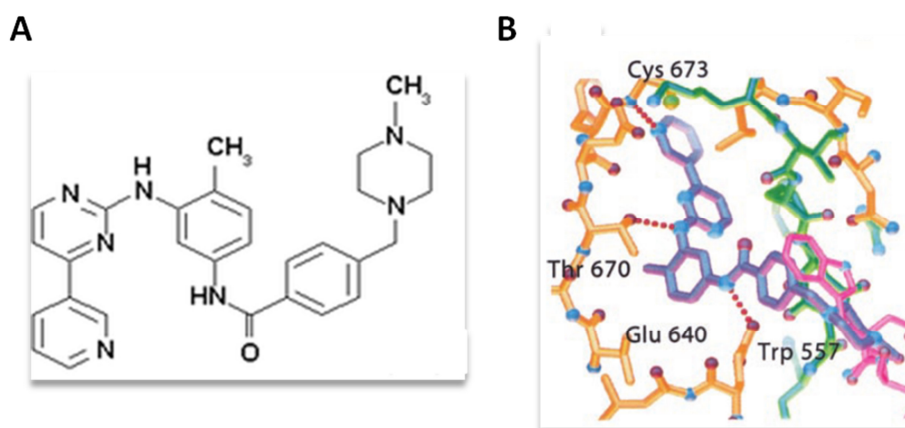


Figure 29 : Structure chimique de l'imatinib et modélisation de son domaine de liaison au récepteur c-Kit

A. Structure chimique de l'imatinib. **B.** Modélisation cristallographique du complexe c-Kit sauvage/imatinib (en violet) (Mol *et al.*, 2004).

c) Mécanismes de résistance, exemple du mutant T670I

De par son schéma d'activation, il apparaît que l'imatinib ne soit pas le traitement optimal de toutes les pathologies présentant une mutation activatrice de c-Kit. En effet, les mutations touchant la boucle d'activation du récepteur, bloquent ce dernier sous forme active, et abolissent ainsi l'effet de l'imatinib (Frost *et al.*, 2002) (Foster *et al.*, 2004).

En 2004, Tamborini *et al.* montre que des patients atteints de GIST avec mutation V560G de c-Kit, traités à l'imatinib mais non répondeurs, présentent une autre mutation de c-Kit. Cette mutation touche le site de fixation de l'imatinib, et conduit à la substitution de la thréonine, en position 670, par une isoleucine (Tamborini *et al.*, 2004). Cette mutation T670I, dit mutation « gate-keeper », induit la déformation de la poche catalytique ainsi que la perte d'un pont hydrogène formé par l'imatinib avec le récepteur c-Kit sauvage. Des analyses biochimiques montrent que ce mutant est totalement insensible à l'imatinib (Tamborini *et al.*, 2006).

A ce jour, l'implication et les mécanismes d'action des ITK sur la forme sauvage de c-Kit reste inexplorée.

II. Introduction de l'étude

Durant les premières étapes de la différenciation érythroïde, le SCF, en induisant l'activation de son récepteur c-Kit, soutient la survie, la prolifération et la différenciation des cellules érythroïdes. En conditions physiologiques, c-Kit est fortement exprimé à la surface des cellules érythroïdes immatures, puis son expression diminue progressivement avec l'apparition de cellules de plus en plus matures. Au laboratoire, des études préliminaires de cytométrie en flux, ont pu mettre en évidence que dans 30% des cas de syndromes myélodysplasiques de faible risque, c-Kit persiste à la membrane des érythroblastes en fin de maturation. Dans plusieurs cultures *ex vivo* de cellules de patients, cette observation a été

reliée à un retard d'acquisition de marqueurs de différenciation érythroïde, tels que le récepteur à la transferrine (CD71) et la GPA (CD235a).

En imaginant que cet ITK pourrait moduler l'expression du récepteur c-Kit sauvage, et en partant de l'hypothèse que l'inhibition de ce dernier favoriserait l'entrée des érythroblastes en différenciation terminale, nous avons étudié, dans un contexte érythroïde, l'impact de l'imatinib sur le récepteur c-Kit sauvage.

Pour ce faire, nous avons utilisé des cellules primaires issues de donneurs sains, ainsi que la lignée érythroleucémique humaine dépendantes de l'EPO et exprimant de manière endogène la forme sauvage de c-Kit, UT-7/EPO.

III. Résultats

Afin de valider ou d'invalidier notre hypothèse initiale, nous avons cultivé puis traité par 2µM d'imatinib, des érythroblastes issus de donneurs sains lorsque leur croissance et leur différenciation étaient indépendantes du SCF.

Les résultats obtenus ont montré que l'ajout d'imatinib au milieu de culture, ne contenant plus de SCF, induit une internalisation du récepteur, ainsi qu'une diminution de son expression protéique. L'étude en cytométrie en flux de l'acquisition des marqueurs de différenciation CD71 et CD235a par les érythroblastes, nous a permis de mettre en évidence une accélération du processus de différenciation terminale ([article Figure 1](#)). Nous avons également observé une accélération de la différenciation érythroïde lorsque l'expression de c-Kit est abolie par l'utilisation de shARN (Données personnelles, Dr Celia Floquet).

Grâce à des analyses par cytométrie en flux, ou par des expériences basées sur la fixation de ¹²⁵I-SCF (permettant de quantifier, en plus de l'expression membranaire, la fonctionnalité de c-Kit), nous avons pu montrer qu'en absence de SCF et en réponse à l'imatinib ainsi qu'à son dérivé, le masitinib, décrit comme étant plus spécifique, les cellules UT-7/EPO perdent l'expression membranaire de c-Kit ([article Figure 2](#)).

Des études en Western blot nous ont permis de montrer que ces drogues induisent également une perte d'expression de la forme mature de c-Kit (à 145kDa), alors que l'expression de la forme immature (à 125kDa) du récepteur n'est quasiment pas atténuée ([article Figure 1 + 4A](#)).

De façon intéressante, il s'avère que l'effet de l'imatinib est réversible, mais qu'il inhibe la ré-expression du récepteur fonctionnel, après son internalisation en réponse au SCF ([article Figure 3](#)).

Ces résultats nous ont donc suggéré que l'imatinib n'inhibait pas le recyclage du récepteur, mais qu'il pouvait induire un défaut de synthèse et/ou de maturation ou une instabilité membranaire de c-Kit.

Nous avons alors réalisé des expériences d'incorporation de ³⁵S-méthionine. Les résultats obtenus n'ont montré aucune modulation de la maturation et de la synthèse du récepteur due à l'imatinib ([article Figure 4D](#)).

Par la suite, nous avons traité des cellules avec un inhibiteur d'internalisation, avec ou sans adjonction d'ITK. Les résultats obtenus ont montré qu'en présence de cet inhibiteur, la méthyl-β-cyclodextrine, l'expression de c-Kit à la membrane n'est pas modifiée par l'imatinib ou par le masitinib. Ces résultats suggèrent donc qu'en réponse à l'imatinib le récepteur c-Kit est internalisé ([article Figure 5A](#)).

Sachant qu'en Western Blot, nous avons observé une diminution de la forme mature du récepteur en présence d'imatinib et de masitinib, nous nous sommes intéressés à la dégradation du récepteur en réponse aux ITK. Les résultats obtenus nous ont permis de montrer que, dans ces conditions, la dégradation de c-Kit est étonnamment indépendante du système c-Cbl/protéasome, classiquement mis en jeu, mais semble dépendante de la voie de dégradation lysosomale ([article Figure 5C + 5D + 6](#)).

Afin de mieux comprendre le processus impliqué dans l'internalisation de c-Kit en réponse aux ITK, nous avons réalisé une étude phospho-protéomique basée sur l'identification de résidus tyrosines phosphorylés après traitement des cellules à l'imatinib. Pour ce faire, nous avons cultivé les cellules UT-7/EPO en milieu dépourvu d'arginine et de

cystéine, auquel nous avons rajouté, le cas échéant, de l'arginine et de la cystéine respectivement alourdis de 6 et 8 Da. Après le traitement des cellules cultivées en milieu « alourdi » par 2 μ M d'imatinib, et suite à une digestion protéique, nous avons immunoprécipité les phospho-peptides, puis nous les avons analysés par spectrométrie de masse sur Orbitrap. Après analyses informatiques, il s'est avéré que l'imatinib n'induit pas de variations globales du profil phosphotyrosine des cellules UT-7/EPO. En effet, les ratios différentiels H/L (pour Heavy/Light) sont compris entre 0.47985 et 1.28554, qui s'avèrent ne pas être statistiquement significatifs ([article Table 1](#)).

Nous avons alors émis l'hypothèse que l'internalisation de c-Kit, en réponse à l'imatinib était la conséquence directe de la liaison de la drogue au récepteur, par l'intermédiaire de sa poche catalytique.

Nous avons donc utilisé des cellules murines BaF-3, exprimant de manière ectopique le mutant T670I de c-Kit, ne pouvant plus lier l'imatinib. Comme décrit dans la littérature, nous avons pu montrer que ce mutant est internalisé en réponse au SCF ou au sorafenib, mais lorsque les cellules sont traitées à l'imatinib, c-Kit n'est pas internalisé ([article Figure 7](#)).

Ces résultats prouvent donc que l'accès de la poche catalytique de c-Kit est indispensable à son internalisation en réponse à l'imatinib.

IV. Conclusion

Au cours de cette étude, nous avons pu montrer qu'en absence de son ligand, le SCF, et en réponse à des inhibiteurs de tyrosine kinase, tels l'imatinib et le masitinib, le récepteur à activité tyrosine kinase de classe III, c-Kit, est internalisé puis dégradé par le lysosome uniquement, de façon indépendante de l'ubiquitine E3-ligase c-Cbl. Nous avons mis en évidence que ces drogues n'ont aucun impact sur le recyclage, la synthèse et la maturation du récepteur. Les expériences de marquages métaboliques en culture différentielle de type SILAC (Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture) nous ont permis de découvrir que le profil de phosphorylation sur tyrosine des cellules érythroleucémiques UT-7/EPO n'est globalement pas modifié par l'imatinib.

Enfin, il apparaît que la fixation de l'imatinib à la poche catalytique de c-Kit est indispensable aux effets observés. En effet, le mutant T670I de c-Kit, ne pouvant plus lier l'imatinib et exprimé de manière ectopique dans la lignée cellulaire murine BaF-3, n'est pas internalisé en réponse à cette drogue, alors que son expression membranaire est diminuée en réponse au SCF ou au sorafenib.

Il semble donc que l'internalisation de c-Kit induite par les ITK et en absence de SCF, résulte d'avantage de la levée de la conformation auto-inhibée du récepteur, qui permet son maintien à la membrane plasmique, que d'une action non spécifique sur d'autres kinases intracellulaires.

V. Perspectives

L'axe de signalisation SCF/c-Kit est essentiel à la différenciation, à la survie et à la prolifération des cellules érythroïdes. Au cours de la différenciation érythroïde normale, c-Kit est fortement exprimé à la surface des progéniteurs érythroblastiques puis son expression diminue avec l'apparition de cellules de plus en plus matures (Uoshima *et al.*, 1995).

Depuis de nombreuses années, l'existence d'une synergie entre c-Kit et le récepteur de l'érythropoïétine, acteur majeur de l'érythropoïèse, est suggérée, mais reste encore sujette à débat. Néanmoins, certaines équipes ont mis en évidence une interaction physique entre les deux récepteurs (Wu *et al.*, 1995b), une dimérisation de c-Kit en réponse à l'EPO (Broudy *et al.*, 1998) ainsi qu'une activation du R-EPO en réponse au SCF (Jacobs-Helber *et al.*, 1997).

De manière intéressante, et au cours de l'analyse phospho-protéomique réalisée sur les cellules UT-7/EPO traitées ou non à l'imatinib et cultivées uniquement sous EPO, nous avons mis en évidence une phosphorylation basale des résidus 703 et 936, de c-Kit (cf **Annexe I**). En conditions physiologiques, ces deux tyrosines servent de points d'ancrage aux

protéines Grb2 et APS, impliquées dans l'internalisation et la dégradation de c-Kit *via* l'ubiquitine E3-ligase c-Cbl (Wollberg *et al.*, 2003) (Sun *et al.*, 2007).

Ces résultats préliminaires suggèrent donc un impact de l'EPO sur la phosphorylation de ces résidus tyrosine, et pourraient relier une signalisation médiée par le récepteur de l'EPO à l'internalisation et à la dégradation de c-Kit, en absence de SCF.

A ce jour, aucune des études menées sur la coopération du R-EPO et de c-Kit n'ont mis en évidence un rôle de la signalisation en aval du R-EPO sur l'internalisation ou la dégradation de c-Kit.

Dans un premier temps, il est indispensable de valider ces observations en Western Blot, sur des UT-7/EPO cultivées sous EPO et en absence de SCF, en utilisant des anticorps spécifiquement dirigés contre les tyrosines 703 et 936 phosphorylées de c-Kit, (respectivement distribués par Cell Signaling® #3073 et par Sigma Aldrich® #C6365). Dans un second temps, il faudrait s'assurer que ces phosphorylations sont bien en lien avec l'internalisation du récepteur c-Kit. Cette analyse pourra être réalisée à l'aide de mutants de c-Kit, présentant des substitutions des tyrosines 703 et 936, générées par une approche de mutagenèse dirigée.

Cependant, et si nous validons ces observations, nous ne pourrions exclure que ces phosphorylations sont constitutives et indépendantes de l'EPO. Afin de répondre à cette question, la comparaison du profil phospho-tyrosine de c-Kit en réponse à l'EPO et condition de sevrage sera indispensable. De manière intéressante, cette analyse a également révélée que la phosphorylation des tyrosines 703 et 936 de c-Kit n'est pas modifiée par la présence d'imatinib (avec des ratio H/L respectifs de 0.96584 et 0.81636), renforçant ainsi l'hypothèse d'un lien avec la signalisation médiée par le R-EPO.

Au cours de la différenciation, les érythroblastes sont séquentiellement dépendants du SCF puis de l'EPO avec une phase de synergie entre les deux cytokines, principalement au stade du proérythroblaste. En effet, les progéniteurs (BFU-E et CFU-E) expriment fortement c-Kit (Ogawa *et al.*, 1991), puis cette expression diminue avec l'entrée des cellules en

différenciation terminale (érythroblastes basophiles, polychromatophiles et acidophiles) (Uoshima *et al.*, 1995). De même, l'expression du R-EPO est maximale à la membrane des proérythroblastes, puis son expression diminue avec la maturation des cellules (Broudy *et al.*, 1991) (Wickrema *et al.*, 1992).

L'analyse du profil phospho-tyrosine de c-Kit à plusieurs stades de la différenciation érythroïde, en rapport avec l'expression membranaire du R-EPO ainsi que de sa signalisation, pourrait également aider à la compréhension d'une communication entre c-Kit et le R-EPO. En effet, il se peut que la possible coopération de c-Kit et de R-EPO dépende de la signalisation EPO/R-EPO et donc du niveau d'expression membranaire du récepteur. Le modèle cellulaire UT-7/EPO pourra également aider à la compréhension de ce mécanisme, *via* différentes études de cinétiques et de doses-réponse d'activation de la signalisation dépendante de l'EPO.

Enfin, dans le contexte pathologique des syndromes myélodysplasiques de faible risque, il a été montré que les progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺ de moelle osseuse pouvaient présenter une surexpression membranaire de c-Kit (Maynadié *et al.*, 2002). Des analyses réalisées au sein du laboratoire, ont quant à elles évoqué une persistance de c-Kit à la membrane des érythroblastes matures dans 30% des cas de patients porteurs d'un SMD de faible risque.

Sachant que l'entrée des érythroblastes en différenciation terminale exige une internalisation de c-Kit, la persistance de ce dernier pourrait être corrélée aux défauts de maturation des érythroblastes observés dans cette pathologie. Il serait donc intéressant d'analyser le profil de phosphorylation des tyrosines 703 et 936 de c-Kit, au cours de la différenciation érythroïde pathologique.

VI. Article

Tyrosine Kinase Inhibitors Induce Down-Regulation of c-Kit by Targeting the ATP Pocket

Diane D'allard^{1,2,3,4,5,6,9}, Julie Gay^{1,2,3,4,5,9}, Clotilde Descarpentries^{1,2,3,4,5}, Emilie Frisan^{1,2,3,4,5}, Kevin Adam^{1,2,3,4,5,6}, Frederique Verdier^{1,2,3,4,5,6}, Célia Floquet^{1,2,3,4,5,6}, Patrice Dubreuil⁷, Catherine Lacombe^{1,2,3,4,5,6,8}, Michaela Fontenay^{1,2,3,4,5,6,8}, Patrick Mayeux^{1,2,3,4,5,6,9}, Olivier Kosmider^{1,2,3,4,5,6,8*}

1 Institut Cochin, Département d'Immunologie-Hématologie, Paris, France, **2** INSERM U1016, Paris, France, **3** Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 8104, Paris, France, **4** Université Paris Descartes, Faculté de Médecine, Paris, France, **5** Equipe Labellisée Ligue Contre le Cancer, Paris, France, **6** LABEX (Laboratoire d'Excellence) GR-Ex, Paris, France, **7** INSERM, U1068, CRCM, Centre de Référence des Mastocytoses-CEREMAST; Institut Paoli-Calmettes, Marseille; Aix-Marseille Université; CNRS, UMR7258, Marseille, France, **8** Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Broca-Cochin-Hôtel-Dieu, Service d'Hématologie Biologique, Paris, France, **9** Proteomic Platform of the Paris Descartes University (3P5), Paris, France

Abstract

The stem cell factor receptor (SCF) c-Kit plays a pivotal role in regulating cell proliferation and survival in many cell types. In particular, c-Kit is required for early amplification of erythroid progenitors, while it must disappear from cell surface for the cell entering the final steps of maturation in an erythropoietin-dependent manner. We initially observed that imatinib (IM), an inhibitor targeting the tyrosine kinase activity of c-Kit concomitantly down-regulated the expression of c-Kit and accelerated the Epo-driven differentiation of erythroblasts in the absence of SCF. We investigated the mechanism by which IM or related masitinib (MA) induce c-Kit down-regulation in the human UT-7/Epo cell line. We found that the down-regulation of c-Kit in the presence of IM or MA was inhibited by a pre-incubation with methyl- β -cyclodextrin suggesting that c-Kit was internalized in the absence of ligand. By contrast to SCF, the internalization induced by TKI was independent of the E3 ubiquitin ligase c-Cbl. Furthermore, c-Kit was degraded through lysosomal, but not proteasomal pathway. In pulse-chase experiments, IM did not modulate c-Kit synthesis or maturation. Analysis of phosphotyrosine peptides in UT-7/Epo cells treated or not with IM show that IM did not modify overall tyrosine phosphorylation in these cells. Furthermore, we showed that a T670I mutation preventing the full access of IM to the ATP binding pocket, did not allow the internalization process in the presence of IM. Altogether these data show that TKI-induced internalization of c-Kit is linked to a modification of the integrity of ATP binding pocket.

Citation: D'allard D, Gay J, Descarpentries C, Frisan E, Adam K, et al. (2013) Tyrosine Kinase Inhibitors Induce Down-Regulation of c-Kit by Targeting the ATP Pocket. PLoS ONE 8(4): e60961. doi:10.1371/journal.pone.0060961

Editor: Ivan Cruz Moura, Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM), France

Received: January 31, 2013; **Accepted:** February 15, 2013; **Published:** April 23, 2013

Copyright: © 2013 D'allard et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from the Ligue Nationale Contre le Cancer (LNCC : Equipe labellisée) and by a grant from the Agence Nationale de la Recherche (ANR, CAPER). DD was supported by a grant from the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement supérieur. JG, CD and CF were supported by a grant from the Association de Recherche contre le Cancer (ARC). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: olivier.kosmider@cch.aphp.fr

These authors contributed equally to this work.

Introduction

The stem cell factor (SCF) receptor c-Kit (also referred as CD117) regulates cell survival, proliferation, and differentiation. C-Kit is a member of the type III subfamily of receptor tyrosine kinase (RTK) that also includes the receptors for M-CSF, Flt-3, and PDGF. Physiologically, c-Kit is expressed on melanocytes, germ cells, mast cells and hematopoietic progenitor cells. C-Kit is required for early erythroid progenitor amplification while its expression must be down-regulated for cells entering terminal differentiation. Accordingly, mice with mutations in the W or Sl Locus encoding c-Kit or SCF respectively, present with a strong anemia [1].

The recent description of the crystal structure of the entire ectodomain of c-Kit before and after SCF stimulation helps the comprehension of c-Kit biology [2]. Indeed, the main consequence of SCF binding is to bring together two molecules of c-Kit. After

ligand binding, c-Kit is phosphorylated and rapidly internalized. However, the fact that intrinsic tyrosine kinase activity is required for driving the internalization of a receptor is still controversial [3–6]. Expression at plasma membrane and ligand-mediated internalization of active mutants of the kinase domain vary according to the targeted residue and, for a given residue, to the type of substitution [7]. For instance, mutation of c-Kit autophosphorylation Y821 or substitution of D816 by a valine or a tyrosine does not abrogate ligand-induced receptor internalization [7, and personal data], while the G559D c-Kit mutant is stabilized at the plasma membrane in the presence of SCF [8]. However, it has been shown that kinase dead mutant of c-Kit is still able to internalize in response to ligand binding, although the rate of internalization decreases. This is consistent with the internalization of the epidermal growth factor (EGF) receptor to occur even if the receptor is inactive [5]. This suggests that ligand binding or ligand-induced dimerization could

be the sole determinant for RTK internalization, independently of tyrosine kinase activation.

Activated c-Kit is then targeted for endocytosis and degradation by the lysosomes. This step requires the ubiquitin ligase Cbl that associates with the tyrosine-phosphorylated receptor. The recruitment of Cbl to c-Kit involves both the C-terminal part of the receptor and its membrane proximal domain. It has been shown that isoleucine 787 is implicated in the internalization process of c-Kit in mice [3]. A substitution of isoleucine by phenylalanine (I787F) which does not affect SCF binding, strongly impairs c-Kit internalization due to ineffective activation of Cbl. The transmembrane domain also recruits Src family kinases that have been shown to participate to Cbl-dependent ubiquitination of c-Kit [9]. Inactivating mutations of *CBL* gene responsible for wild type (wt) c-Kit overexpression have been identified in myeloproliferative disorders or mastocytosis [10]. Furthermore, expression of an activated mutant of c-Kit, or a deregulated production of SCF have been implicated in the pathophysiology of leukemias, mastocytosis, gastrointestinal stromal tumors and lung carcinomas for a long time [for review, 11]. Therefore, c-Kit may represent an attractive target for many therapeutic approaches.

Tyrosine kinase inhibitors (TKI) like imatinib (IM) or masitinib (MA), which enter the ATP binding pocket and competitively inhibit ATP binding and receptor kinase activity, have been shown to block constitutively active mutants [12–16]. The clinical response to these compounds depends on the type of mutations. Furthermore, the knock-down of wt c-Kit overexpression, using a siRNA strategy efficiently reduces c-Kit-driven cell proliferation [16]. Thus, either direct targeting of active mutant or inhibition of c-Kit expression are two different ways for reducing c-Kit tumorigenicity.

In the present work, we report that down-regulation of wt c-Kit is efficiently driven by IM or MA that induce c-Kit internalization and its subsequent lysosomal degradation in the absence of ligand. Accessibility of IM to the ATP binding pocket of c-Kit is required for the internalization process to occur. In normal erythroblasts, c-Kit down-regulation by IM forces Epo-dependent final maturation.

Materials and Methods

Reagents

Highly purified recombinant human SCF was from Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Germany) and Epo was a gift of Dr M. Brandt (Roche, Penzberg, Germany). Insulin-like growth factor (IGF)-1 and dexamethasone were purchased from Sigma Aldrich (St Louis, MO). Imatinib mesylate (IM) and masitinib mesylate (MA) come from the laboratory of Dr P. Dubreuil. The proteasome inhibitor N-Ac-Leu-Leu-norLeucinal (LLnL) was purchased by Calbiochem (Merck Biosciences, Darmstadt, Germany). Methyl- β -cyclodextrine (M β CD), methylamine and cycloheximide (CHX) were purchased from Sigma Aldrich. Sorafenib was obtained from Santa Cruz (SantaCruz Biotechnologies, Santa-Cruz, CA). For flow cytometry, CD117 antibodies to c-Kit coupled to phycoerythrin cyanin 5 (PC5) was purchased from Beckman Coulter (Miami, FL). Antibodies directed against c-Kit for immunoblot and immunoprecipitation were purchased from Cell Signaling (Cat ref. 3074, Danvers, MA), anti-Kit phosphotyrosine (pKit-Y719) were from Cell Signaling (ref. 3391) anti-Epo-R antibodies were from SantaCruz, and anti-actin antibodies were from Sigma Aldrich.

Cell lines and culture conditions

Human UT-7/Epo cells previously described by Komatsu and colleagues [36] and were cultivated in α -minimum essential

medium (α MEM) containing 10% fetal calf serum, 1 mM glutamine, 100 UI/ml penicillin-streptomycin and 1 U/ml Epo. UT-7/Epo cells were stably transfected by electroporation with pcDNA1 plasmid encoding hemagglutinin (HA)-tagged wt c-Cbl or the 70Z c-Cbl mutant that lacks E3 ligase activity, and transfected cells were selected using G418. Plasmids encoding wt c-Cbl and 70Z c-Cbl were a gift from Pr Y Yarden from the Department of Biological Regulation, at Weizmann Institute of Science (Rehovot, Israel). For SILAC experiment, UT-7/Epo cells were cultivated in MEM medium minus L-Lysine and L-Arginine (Pierce) supplemented with 0.1 mg/ml 13C6 L- Arginine-HCl (Pierce) and 0.1 mg/ml 13C6, 15N2 L-Lysine-2HCl (Pierce, “heavy medium”), or the same concentrations of L-Arginine (Sigma) and L-Lysine (Sigma, “light medium”) and containing 10% dialyzed fetal calf serum and 1 U/mL Epo. For a total integration of amino acids, cultures last 5 weeks. Murine BaF-3 cells previously described by Collins and colleagues [38] were transfected with a hKit WT or the gatekeeper hKit T670I mutant were cultivated under murine IL3 stimulation in Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI), containing 10% fetal calf serum, 1 mM glutamine, and 100 UI/ml penicillin-streptomycin as previously described [37]. Before experiments, cells were selected by two days of culture without IL3 plus SCF 100 ng/mL to amplify only cells expressing an ectopic c-Kit. These cell lines were a gift from Dr P Dubreuil from the Centre de Recherche en Cancérologie, at Marseille, France. For human primary erythroblast cultures, CD34⁺ progenitors were purified on MidiMacs system (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany) in the mononuclear cell fraction isolated from cytopheresis on Ficoll gradient as previously described [17]. During the amplification phase, CD34⁺ progenitors were seeded for 10 days in the presence of 1 UI/ml Epo, 100 ng/ml SCF, 40 ng/ml IGF-1 and 1 μ M dexamethasone and further cultured for 7 days with 1 UI/ml Epo and 40 ng/ml IGF-1 for cells to enter the terminal erythroid maturation, as previously described [17].

Cell stimulation

UT-7/Epo cells cultivated under Epo stimulation were treated by imatinib (IM) or masitinib (MA) or vehicle at different time points and at different concentrations. In other experiments, UT-7/Epo were preincubated with 50 μ M M β CD for 30 min, 50 μ M LLnL for 20 min, or 100 μ M methylamine for 20 min before treatment with imatinib or masitinib or vehicle for 4 h. Alternatively, UT-7/Epo (cultivated under Epo) or BaF-3 cell lines (cultured under IL3) were treated for 4 h with 1 or 5 μ M sorafenib.

Flow cytometry

C-Kit or CD71 cell surface expression was analyzed by flow cytometry using CD117-PC-5 or CD71-FITC antibodies. All data were acquired on a Cytomics FC500 flow cytometer and analyzed using Cytomics RXP Analysis (Beckman Coulter, Inc.).

Peptides purification and immunoprecipitation of phospho-Tyr-peptides

UT-7/Epo cells cultivated in heavy medium were treated 4 h with 2 μ M imatinib while control cells cultivated in light medium were treated with DMSO alone. After two washes in PBS, 50.10⁶ UT-7/Epo cells, of each culture conditions, were resuspended in 2.5 mL of lysis buffer (20 mM hydroxyethyl piperazineethanesulfonic pH 8, 8M urea, 1 mM sodium orthovanadate, 2.5 mM sodium pyrophosphate and 1 mM sodium β -glycerophosphate), sonicated twice 30 seconds and keep in ice for 20 minutes.

Lysates were centrifuged at 20,000 g for 20 minutes at 4°C. Supernatants were successively treated with DTT to reduce disulfide bonds and chloroacetamide for alkylation. Equal amounts of proteins from both samples were mixed and digested by trypsin over night at 30°C. Peptides were purified on Sep-Pack C18 Classic micro column (Waters, ref. WAT051910) and on HyperSep Hypercarb SPE Columns (ThermoScientific, ref. 60106–301). After lyophilization, peptides were solubilized in Immunoaffinity Purification (IAP) buffer (50 mM 3-(N-Morpholino) propanosulfonic acid, 10 mM sodium phosphate, 50 mM NaCl, pH 7.4) and immunoprecipitated with anti-phospho-Tyr antibodies (Cell Signaling, ref. 7902). Immunoprecipitated phospho-peptides were eluted in 1% trifluoroacetic acid and analyzed by mass spectrometry using an Ultimate 3000 Rapid Separation Liquid Chromatographic (RSLC) system hyphenated to a hybrid LTQ-OrbitrapVelos mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific). Peptides were separated on a C18 reverse phase resin (2 µm particle size, 100 Å pore size, 75 µm i.d., 15 cm length) with a 27 min gradient from 100% A (2% ACN, 0.1% formic acid and 98% H₂O) to 30% B (80% ACN, 0.085% formic acid and 20% H₂O). The mass spectrometer was operated in a data dependent scan with a full MS scan acquired with the Orbitrap followed by up to 10 LTQ MS/MS CID or ETD spectra on the most abundant ions detected in the MS scan. ETD fragmentation was performed if one of the following events was met: $z = 3$ and $m/z < 650$ m/z , $z = 4$ and $m/z < 900$ m/z or $z = 5$ and $m/z < 950$ m/z . Whenever neutral loss at 24.5, 32.6, 49 or 98 m/z was detected, multistage activation (MSA) was performed. Mass spectrometer settings were: full MS (AGC: 1×10^6 , resolution: 6×10^4 , m/z range 400–2000, maximum ion injection time: 500 ms); MS/MS (AGC: 5×10^3 , maximum injection time: 200 ms, minimum signal threshold: 500, isolation width: 2 Da, dynamic exclusion time setting: 30 s). The fragmentation wasn't permitted for precursor with $z = 1$. Data were analyzed using the MaxQuant 1.3.0.5 software [18]. Mass spectrometry analyses were performed by the proteomic facility of the Paris Descartes University (3P5).

C-Kit internalization studies

SCF or Epo was labeled using IODO-GEN (Pierce, Rockford, IL) and [¹²⁵I]SCF or [¹²⁵I]Epo binding was performed as previously described [19,20]. 2×10^6 UT-7/Epo cells were used in each assay. Saturating [¹²⁵I]SCF (200 ng/ml) or [¹²⁵I]Epo concentrations (1 UI/ml) were added to suppress the effects of putative modifications of receptor affinity induced by the different inhibitors used. Non-specific binding, determined using a 250-fold excess of unlabeled cytokine, was less than 5% of total binding in each case. After 2 washes in PBS pH 7.4, cell-bound radioactivity was counted. All reported data represent specific binding. Each experiment was performed at least 3 times with similar results.

Western blotting

Cells (5×10^5) were solubilized in 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM ethylene diamine tetracetic acid (EDTA), 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1% Nonidet-P40 plus protease inhibitors (Complete, Roche). After sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), immunoblots were performed using primary antibodies followed by secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase (Cell Signaling) and revealed by chemiluminescence detection (GE Healthcare). The images were captured using a CCD camera (LAS3000 from FujiFilm) and quantified using Multigauge software from Fujifilm.

Metabolic labeling and c-Kit immunoprecipitation

UT-7/Epo cells were pre-incubated for 4 h with or without imatinib in Met- and Cys-deficient α -MEM culture medium

(Sigma Aldrich, M2289) containing 5% dialyzed fetal bovine serum, 1 mM glutamine, 100 UI/ml penicillin-streptomycin and 2 U/ml Epo. After pre-incubation, the cells were pulse-labeled for 15 min in the same medium containing 0.25 mCi/ml of a mixture of [³⁵S]Met and [³⁵S]Cys (Translabel, Perkin Elmer, Courtaboeuf, France) and chased by incubation in a medium containing unlabeled Met and Cys. Cells were either solubilized in 150 µL of lysis buffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7.4, 1% NP-40, 0.5% deoxycholic acid and 0.1% SDS, protease inhibitors and 1 mM sodium orthovanadate, 20 mM sodium fluorure, 1 mM sodium pyrophosphate, 25 mM sodium beta-glycerophosphate as phosphatase inhibitors). Lysates were centrifuged, cleared using unspecific antibodies, and precipitated using anti-c-Kit antibody or control immunoglobulins. Immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE, and labeled proteins were detected by fluorography using Amplify on a Typhoon fluorescence scanner (GE Healthcare).

Results

Imatinib or masitinib decreases cell surface expression of mature c-Kit in human erythroblasts and UT-7/Epo cell line

C-Kit expression must be turned off for the erythroid progenitors to enter the final steps of differentiation. Here, we speculated that inhibition of c-Kit tyrosine kinase activity by TKI could facilitate erythroid cell maturation. To evaluate the effect of imatinib on erythroid cell differentiation, we used a two-phase model of *in vitro* differentiation. Using mobilized peripheral blood CD34⁺ progenitors, we obtained erythroid progenitors after 10 days of culture in the presence of Epo, SCF, IGF-1 and dexamethasone. At day 10, cells were washed and reseeded in differentiation medium containing Epo and IGF-1 either in the presence or absence of imatinib for 4 days. As shown in Figure 1A, the presence of imatinib strongly accelerated the acquisition of erythroid marker glycophorin A (GPA) after 2 and 4 days of treatment. Then we analyzed the expression of c-Kit at the time of the onset of erythroid maturation. As shown by flow cytometry, the expression of c-Kit at plasma membrane was fully inhibited after 4 days (Figure 1B, left). By Western blot (Figure 1B, right), we observed a dramatic reduction of the expression of the mature 140 kDa form of the protein.

To investigate the mechanism of c-Kit down-regulation, we used the Epo-dependent UT-7/Epo cell line that expresses endogenous c-Kit. We first assessed the specificity of imatinib on the expression functional c-Kit receptors, we quantified the specific binding of [¹²⁵I]SCF or [¹²⁵I]Epo to their receptors at cell surface in the presence of 2 µM imatinib incubated for 0 to 24 h at 37°C (Figure 1C). We observed that imatinib efficiently reduced [¹²⁵I]SCF binding but did not modify [¹²⁵I]Epo binding. Thus, imatinib reduced the level of functional c-Kit receptors, while it did not affect the cell surface expression of the Epo-R. The decrease of SCF binding was detectable after 2 h of incubation with imatinib and was maximal after 4 h. As expected, since imatinib targeted c-Kit, the UT-7/Epo cell line proliferation in response to SCF was completely abolished by imatinib. By contrast, Epo-induced proliferation was not modified (Figure 1D). These results show that imatinib induces the down-regulation of functional c-Kit at plasma membrane.

To investigate whether the mechanism of down-regulation induced by TKI differed or not from that induced by the natural ligand of c-Kit, we compared the membrane expression of CD117 by flow cytometry after incubation with SCF for 10 min or increasing concentrations of imatinib or masitinib for 4 h

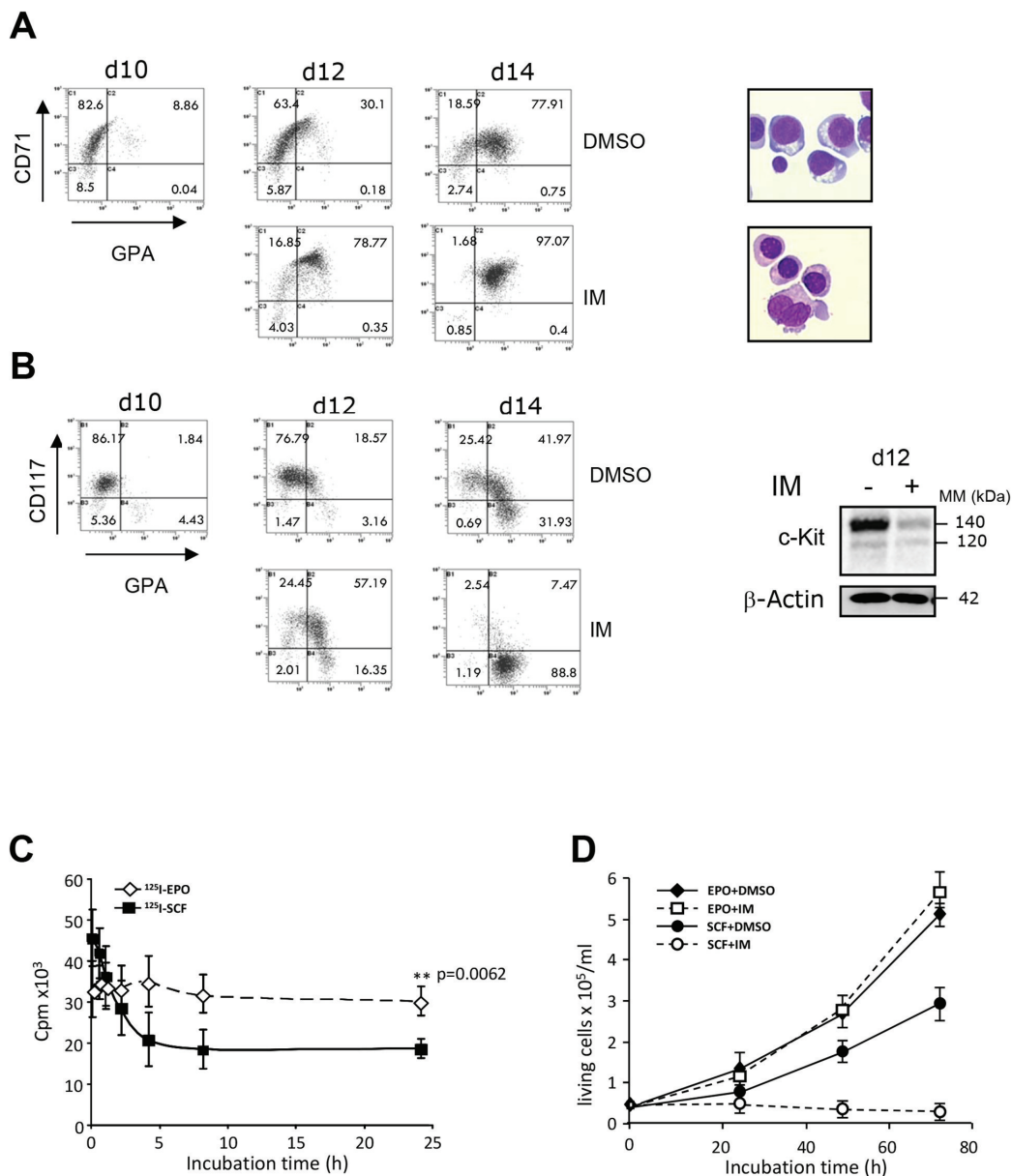


Figure 1. Imatinib induces the differentiation of human normal erythroblasts and decreases cell surface expression of c-Kit. Imatinib (2 μ M) was added for 4 days to a culture of CD34⁺ cells-deriving erythroblasts. **A. Effect of imatinib on erythroblast differentiation.** Left panel: Flow cytometry for CD71 and GPA markers. Right panel: May Grunewald Giemsa staining at Day 14 (d14). **B. Effect of imatinib on c-Kit expression.** Left panel: Flow cytometry for CD117 and GPA. Right panel: Immunoblot for c-Kit. **C. Expression of functional c-Kit at cell surface.** UT-7/Epo cells were incubated with 2 μ M imatinib, or vehicle at 37°C for indicated times, and labeled with 200 ng/ml [¹²⁵I]SCF or 1 UI/ml [¹²⁵I]Epo for 90 min at 4°C. Cell surface-associated radioactivity was counted. Results are the mean of at least three independent experiments. **D. UT-7/Epo cell proliferation in response to SCF.** UT-7/Epo cells were incubated with 1 UI/ml Epo or 50 ng/ml SCF, in the presence or absence (vehicle) of 2 μ M imatinib (IM). At the indicated times, cells were counted in triplicates. doi:10.1371/journal.pone.0060961.g001

(Figure 2A). In these conditions, CD117 signal expressed as a ratio of median fluorescence intensity (RFI) decreased according to the increase of inhibitor concentration. The effect was identical to that of SCF with 2 μ M of each inhibitor. On the same experiments neither imatinib nor masitinib affected the expression of surface marker CD71 corresponding to the type 1 transferrin receptor (data not shown). When compared to SCF, TKI were able to induce c-Kit down-regulation with different kinetics. After 10

minutes of stimulation by SCF, cells expressed less than 50% of the initial level of c-Kit at the plasma membrane, while this maximal down-regulation was observed after 4 h of imatinib or masitinib (Figure 2B). Down-regulation remained stable after 24 h both in the presence of inhibitors or ligand (Figure 2B). We obtained the same results in human erythroid TF-1 cell line and in murine BaF3 cell line stably transfected with human *wt* form of c-Kit (Figure S1). This suggests that TKI induced a down-regulation of

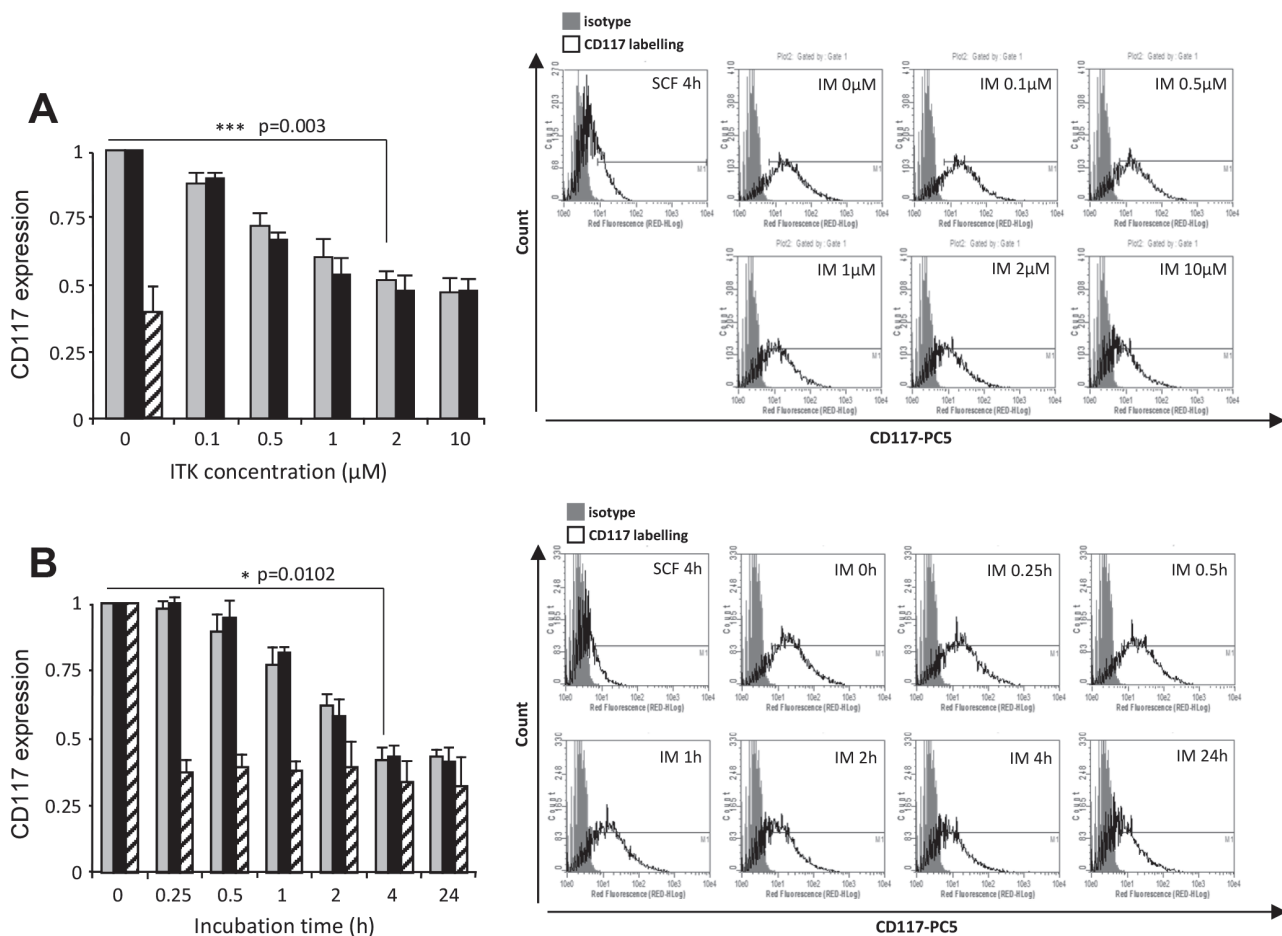


Figure 2. Imatinib or masitinib decreases cell surface expression of mature c-Kit in UT-7/Epo cell line. A. Dose-dependent inhibition of c-Kit expression by TKI. Cell surface expression of c-Kit. UT-7/Epo cells were incubated with SCF 50 ng/ml for 10 min (hatched bars) or indicated concentrations of imatinib (IM) (grey bars) or masitinib (MA) (black bars) for 4 h. **B. Kinetic of c-Kit down-regulation by TKI.** UT-7/Epo cells were incubated with 2 μM IM (grey bars) or MA (black bars) or 50 ng/ml SCF (hatched bars) for indicated times. **C-Kit cell surface expression was determined by flow cytometry.** Results were expressed as ratios of median fluorescence intensity (RFI), and the values were normalized to untreated cells. Results are the mean of at least three independent experiments. doi:10.1371/journal.pone.0060961.g002

c-Kit through a mechanism that could differ from the down-regulation following SCF binding.

Imatinib prevents c-Kit re-expression after ligand-induced down-regulation

We then addressed the question of the reversibility of imatinib effect on c-Kit. We treated UT-7/Epo cells for 2 h with either imatinib or SCF which provoked a 50 or 75% reduction of CD117 expression, respectively. Cells were washed and seeded for an additional period of 22 h in Epo-containing culture medium without imatinib or SCF. CD117 started to be re-expressed 2 h after imatinib or SCF withdraw and reached the baseline after 24 h demonstrating that the effect was reversible (Figure 3A). To investigate the impact of imatinib on the expression of functional receptor at cell surface after ligand-induced down-regulation, UT-7/Epo cells were pre-incubated with 50 ng/ml SCF for 2 h to induce c-Kit down-regulation before adding imatinib to Epo-containing medium for 24 h. While [¹²⁵I]SCF binding was reduced by 75% by a 2-h pre-treatment with SCF, [¹²⁵I]SCF ligation remained low over a period of 24 h in the presence of imatinib (Figure 3B) demonstrating that imatinib prevented c-Kit re-expression at the cell surface. By

contrast, expression of functional c-Kit receptors was normalized when cells were re-seeded in Epo-containing medium without imatinib. Notably, a slight increase in c-Kit expression in UT-7/Epo maintained under Epo is observed and maybe correlated to the cell proliferation rate. This suggests that imatinib may inhibit either c-Kit protein synthesis or its cell surface stability.

Imatinib does not inhibit c-Kit protein neosynthesis and maturation

Because the maximal effect of TKI on c-Kit expression was delayed compared to the effect of SCF, we first wondered whether imatinib and masitinib affected the expression of mature or immature or both forms of the receptor. We thus analyzed the effect of increasing concentrations or incubation times of the inhibitors on c-Kit protein expression by Western blot using an antibody specific for both forms. As shown in Figure 4A and 4B, both imatinib and masitinib reduced the expression of the mature glycosylated form of 140 kDa from a concentration of 0.5 μM, while the expression of immature 120-kDa form remained constant regardless of the TKI concentration used in UT-7/Epo cells cultured under Epo. The auto-phosphorylation of c-Kit on

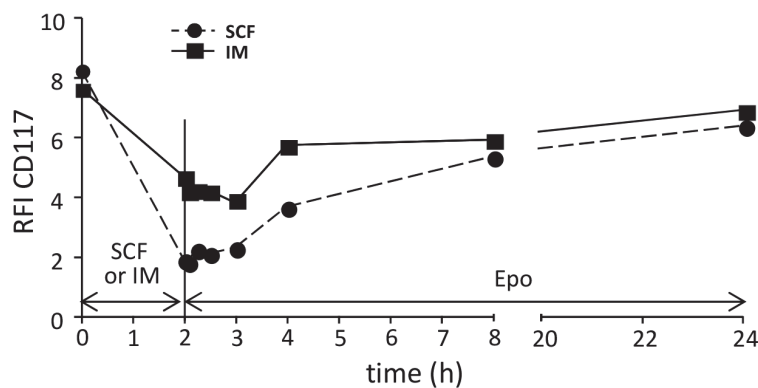
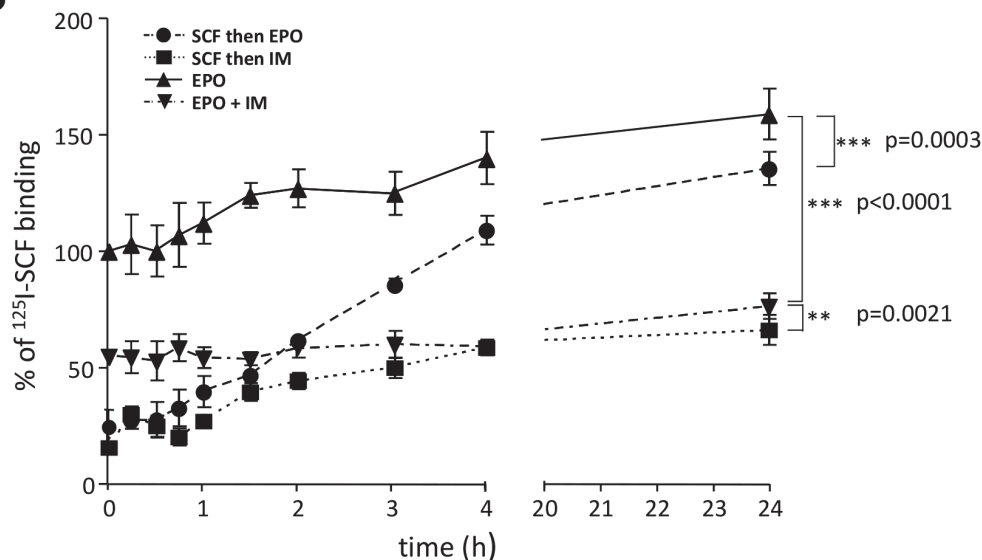
A**B**

Figure 3. Imatinib prevents c-Kit receptor re-expression after SCF-induced down-regulation. A. Down-regulation of c-Kit by imatinib is reversible. UT-7/Epo cells were incubated with 50 ng/ml SCF (dotted line) or with 2 μ M imatinib (filled line) for 2 h. After washing in PBS, cells were cultured with 1 UI/ml Epo for 24 h. CD117 expression was measured at the indicated times by flow cytometry and results were expressed as RFI. **B. Imatinib prevents the re-expression of functional c-Kit after SCF binding.** UT-7/Epo cells were pre-incubated with 50 ng/ml SCF. After washing in PBS, SCF-treated cells were re-seeded with 1 UI/ml Epo in the presence or absence of 2 μ M IM for 24 h. Cells cultured with 1 UI/ml Epo in the presence or absence of IM were used as controls. At indicated times, cells were labeled with 200 ng/ml [¹²⁵I]SCF for 90 min at 4°C and the radioactivity was determined. Results were expressed as percentages of [¹²⁵I]SCF binding to Epo alone at time 0 and are the mean (\pm SD) of three independent experiments.

doi:10.1371/journal.pone.0060961.g003

Tyr719 is only observed after a short term stimulation by SCF (10 min). Consistent with the flow cytometry data, both inhibitors at a concentration of 2 μ M efficiently reduced the expression of the mature form of c-Kit after 4 hours of incubation (Figure 4B), as already observed in normal erythroblasts (Figure 1B right).

To investigate whether imatinib modulate c-Kit synthesis and maturation, we first used 500 μ M of cycloheximide (CHX) to block protein synthesis. UT-7/Epo cells were incubated with CHX alone or in combination with imatinib at indicated times and functional c-Kit receptors were quantified by measurement of [¹²⁵I]SCF binding. In accordance with a 24-h long half-life of this receptor, CHX alone reduced the binding by 50% after 24 h [11]. While [¹²⁵I]SCF binding decreased by 50% after 6 h of incubation

with imatinib only and then remained constant, cell incubation with both CHX and imatinib reduced c-Kit expression by 90% after 24 h (Figure 4C, upper panel). As expected, CHX affected both mature 140 kDa-form and immature 120 kDa form of c-Kit, while imatinib only altered the expression of the mature form (Figure 4C, bottom panel). Finally, imatinib and CHX had an additive inhibitory effect on the expression of mature and functional c-Kit protein (Figure 4C). Altogether, these results suggest that the effect of imatinib may differ from that of CHX suggesting that imatinib did not affect protein synthesis but induced c-Kit degradation.

To precise whether imatinib could modulate c-Kit synthesis, UT-7/Epo cells were pre-incubated for 4 h in the presence or

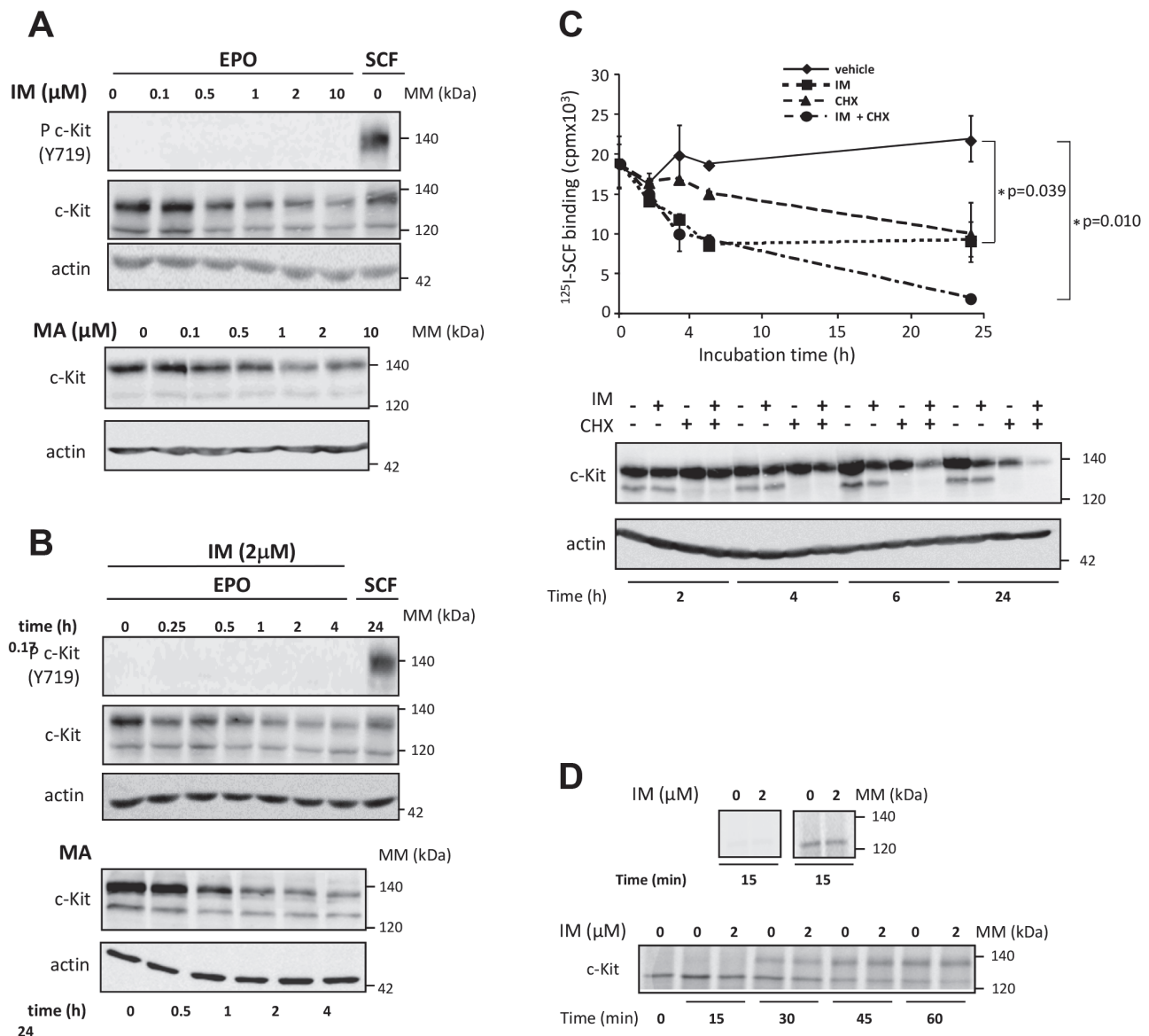


Figure 4. Imatinib or masitinib induces the down regulation of c-Kit but does not influence c-Kit neosynthesis and stability. A and B. Expression of mature (140 kDa) and immature (120 kDa) forms of c-Kit. UT-7/Epo cells were incubated with indicated concentrations of imatinib (IM) or masitinib (MA) for 4 h or with 50 ng/ml SCF for 10 min (A) or with 2 μ M IM or MA for indicated times (B). Phospho c-Kit (Tyr719) and c-Kit were revealed by immunoblot and actin was used as loading control. All data are representative of at least three independent experiments. **C. Effect of protein synthesis inhibitor cycloheximide and imatinib on the expression of cell surface functional c-Kit.** UT-7/Epo cells were incubated with 2 μ M imatinib (IM) or vehicle, in the presence or absence of 500 μ M cycloheximide (CHX) for 24 h. At indicated times, cells were labeled with 200 ng/ml [125 I]SCF for 90 min at 4°C and the radioactivity was determined and expressed as absolute values. Results are the mean of three independent experiments. Alternatively, cell lysates were analyzed for c-Kit expression by immunoblot (lower panel). Actin is used as loading control. **D. c-Kit *de novo* synthesis and maturation.** C-Kit *de novo* synthesis was analyzed in the upper panel UT-7/Epo cells (5.10^5) were preincubated for 4 h in the presence or absence of 2 μ M imatinib (IM) and then labeled with [35 S]Met/Cys-containing medium for 15 min at 37°C. Immunoprecipitation (IP) was performed using isotopic control (left panel) or anti-c-Kit antibodies (right panel). C-Kit maturation was studied on lower panel. UT-7/Epo (5.10^5) cells were pulse-labeled with [35 S]Met/Cys for 15 minutes and chase followed by c-Kit immunoprecipitation using anti-c-Kit antibodies was done for indicated times after incubation with IM (2 μ M) or vehicle. Labeled c-Kit was revealed by fluorography. Results are representative of three independent experiments. doi:10.1371/journal.pone.0060961.g004

absence of 2 μ M imatinib. Then, [35 S]Cys/Met was incorporated for a pulse of 15 min. Radio-labeled c-Kit was revealed after immunoprecipitation. As shown in Figure 4D (upper panel), the level of immunoprecipitated c-Kit was identical in both conditions suggesting that imatinib did not affect c-Kit *de novo* synthesis. To

investigate the effect of imatinib on c-Kit maturation, we labeled UT-7/Epo cells for 15 min with [35 S]Cys/Met before to chase over a period of 1 h in the presence or absence of 2 μ M imatinib. As shown in Figure 4D (bottom panel), imatinib did affect neither the neosynthesis of the 120 kDa form nor the level of 140 kDa

mature form of c-Kit confirming that protein neosynthesis and its glycosylation was not impaired by the drug. Taken together, these data show that imatinib did not alter c-Kit biosynthesis. Its additive effect with CHX-mediated inhibition could lead to hypothesize that imatinib may alter c-Kit protein stability.

Imatinib or masitinib induces c-Kit internalization and its degradation by the lysosomes pathway

To investigate the mechanism of c-Kit modulation by imatinib or masitinib, we first incubated UT-7/Epo cells with 50 μ M methyl β cyclodextrin (M β CD) for 30 min before adding 2 μ M imatinib or masitinib for 4 h. M β CD has been shown to inhibit internalization of cell surface proteins regardless of their association with raft microdomains [21,22]. As shown in Figure 5A, M β CD fully blocked the inhibitory effect of TKI on CD117 expression (upper panel) by preserving the expression of mature 140-kDa form of c-Kit under TKI. This suggests that imatinib or masitinib induced the internalization of c-Kit. To precise the pathway of c-Kit degradation following imatinib or masitinib-driven internalization, we pre-incubated the cells with either LLnL, a proteasome inhibitor, or methylamine which could prevent lysosome acidification and inhibits protein degradation by lysosome proteases. We observed that the decrease of CD117 or the disappearance of mature c-Kit was not affected by LLnL (Figure 5B), while the disappearance of the mature 140-kDa form

was rescued by methylamine (Figure 5C). Epo-induced EpoR degradation was tested to ascertain the effects of LLnL and methylamine since we have previously demonstrated that proteasome inhibitors protect the cell surface form of the activated EpoR [20]. As expected, LLnL prevented the degradation of the mature form of EpoR (figure 5B). Interestingly, methylamine did not rescue membrane c-Kit expression tested by flow cytometry neither in SCF- nor in TKI-treated cells suggesting that receptors accumulate inside rather than being re-expressed at plasma membrane. We conclude from these experiments that c-Kit was internalized upon SCF binding or imatinib or masitinib treatment in the absence of ligand and degraded through the lysosome pathway.

c-Cbl is not implicated in imatinib-driven internalization and degradation of c-Kit

It has been previously shown that interaction between c-Kit and E3 ubiquitin ligase c-Cbl proteins, upon SCF stimulation results in their mutual degradation [9,23]. C-Kit binds to and induces the phosphorylation of c-Cbl proteins, which in turn act as E3 ubiquitin ligases, mediating the ubiquitination, internalization and lysosome degradation of c-Kit. To investigate whether c-Cbl was implicated in the down-regulation of c-Kit by imatinib, we expressed either a mutant 70Z-c-Cbl which is a 17-amino acid deletion mutant (at the boundary of the linker and the RING

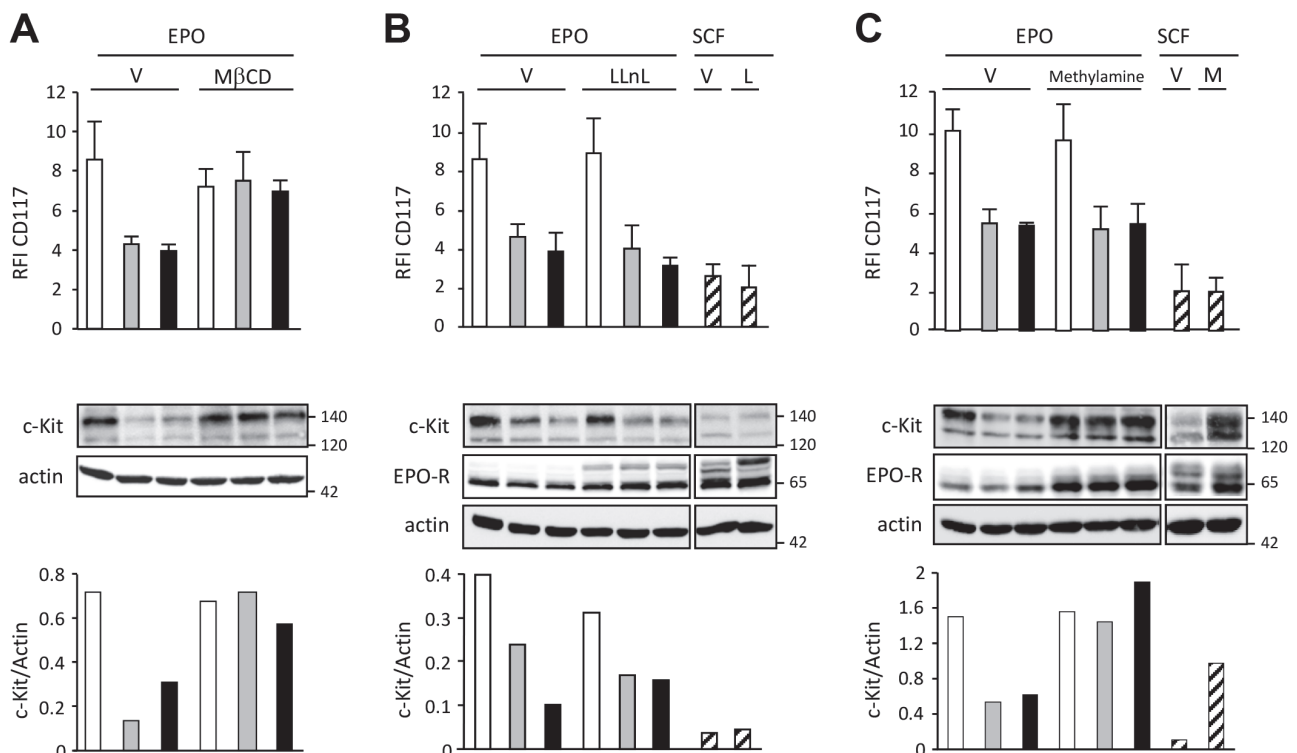


Figure 5. Imatinib or masitinib induces c-Kit internalization and its degradation by lysosome pathway. **A.** For analysis of internalization, UT-7/Epo cells were pre-incubated with 50 μ M of methyl- β -cyclodextrine (M β CD) or vehicle (V) for 30 min then treated during 4 hours with imatinib (grey bars) or masitinib (black bars) or Epo alone (white bars). **B.** For the analysis of proteasomal degradation, UT-7/Epo cells were incubated with 1 UI/ml of Epo or 50 ng/ml of SCF (hatched bars), and 50 μ M of LLnL (L) or vehicle (V) for 20 min at 37°C before treatment with 2 μ M IM (grey bars) or MA (black bars) or Epo alone (white bars) for 4 h. **C.** For the analysis of lysosomal degradation, UT-7/Epo cells were incubated with 1 UI/ml Epo or 50 ng/ml SCF, and 100 μ M methylamine (M) or vehicle (V) for 20 min before treatment with 2 μ M IM (grey bars) or MA (black bars) or Epo alone (white bars) for 4 h. Expression of c-Kit by flow cytometry (cell surface) and by immunoblot. Actin was used as loading control. Data are representative of three independent experiments and the quantification of one experiment is shown. doi:10.1371/journal.pone.0060961.g005

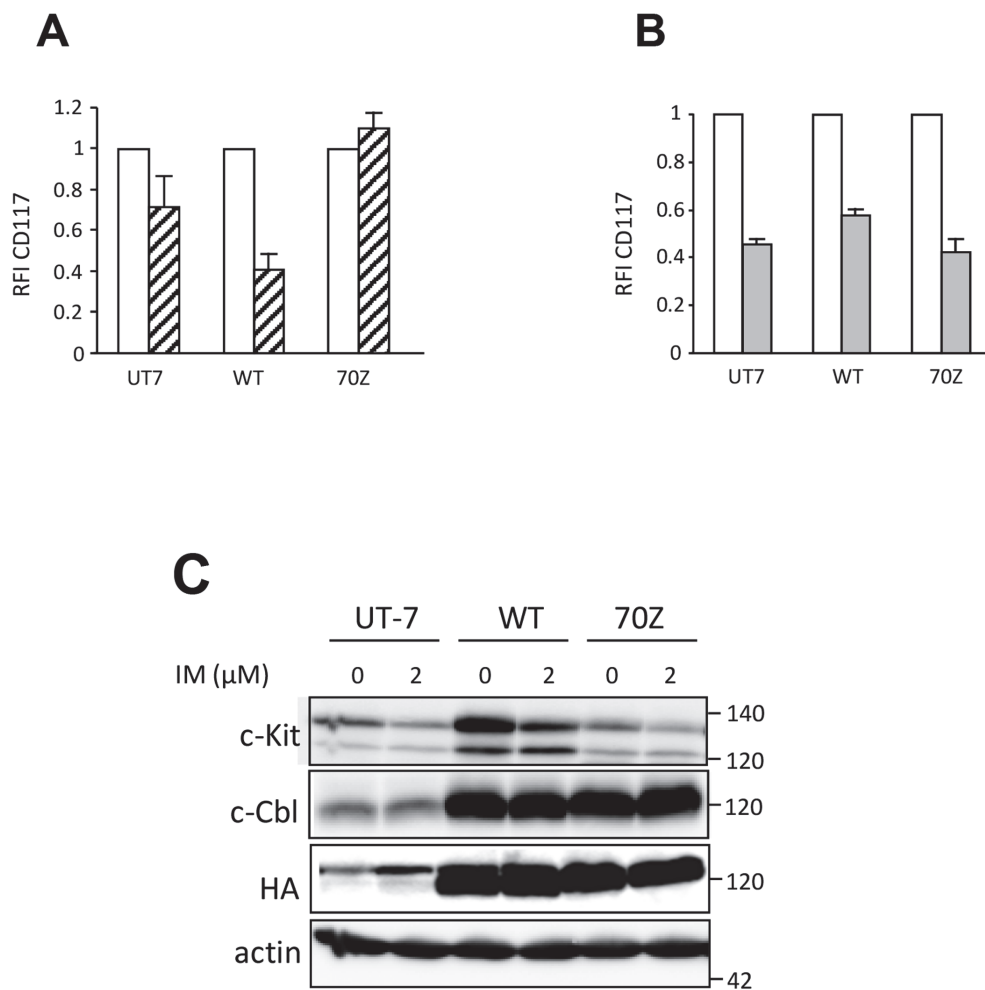


Figure 6. c-Kit internalization occurs independently of c-Cbl. A. Cell surface expression of c-Kit after SCF binding. UT-7/Epo either non transfected (UT-7), or transfected with WT c-Cbl (WT) or 70Z c-Cbl mutant (70Z) were cultured with 1 UI/ml Epo (white bars), starved and then stimulated for 5 min with 250 ng/ml SCF (hatched bars). C-Kit cell surface expression was determined by flow cytometry. Results were expressed as RFI of CD117 normalized to cells in Epo alone and are the mean of three independent experiments. **B. Cell surface expression of c-Kit after imatinib treatment.** Parental, WT c-Cbl and 70Z c-Cbl-UT-7/Epo cells cultured with 1 UI/ml Epo (white bars) were treated for 24 h with 2 μM imatinib (grey bars). C-Kit cell surface expression was determined by flow cytometry and the results were expressed as RFI of CD117 normalized to cells in Epo alone and are the mean of three independent experiments. **C. Immunoblot analysis of c-Kit after imatinib treatment.** Parental, wt-c-Cbl and 70Z c-Cbl-UT-7/Epo cells were incubated with 2 U/ml Epo in the presence or absence of 2 μM IM for 24 h. Immunoblots using anti-c-Kit, c-Cbl and HA antibodies. Actin is used as loading control. Results are representative of three independent experiments. doi:10.1371/journal.pone.0060961.g006

finger domain), abrogating the E3 ubiquitin ligase function of c-Cbl or the *wt* c-CBL protein in UT-7/Epo cells. Notably, c-Kit expression in UT-7/Epo harboring a *wt* c-CBL is reproductively increased in comparison to UT-7/Epo parental cells. However, this overexpression of c-Kit is not associated with a high rate of proliferation under SCF stimulation (data not shown) and is actually not investigated. The cell surface expression of c-Kit decreased in response to SCF in the parental UT-7/Epo cell line and in the *wt* c-Cbl-transfected UT-7/Epo cells, while it remained stable in the 70Z-c-Cbl-transfected cells (Figure 6A). We then treated the cells with 2 μM imatinib for 4 h before analyzing CD117 expression by flow cytometry and c-Kit protein by Western blot. As shown in Figures 6B and 6C, 70Z-c-Cbl did not prevent the disappearance of CD117 from plasma membrane or the decrease of mature 140-kDa form induced by the drug. This result shows that c-Cbl was not implicated in the degradation of c-Kit upon imatinib treatment.

Imatinib does not modulate the content of phosphotyrosine-peptides

Since IM could inhibit several tyrosine kinases in addition of c-Kit, we tested whether IM modified overall tyrosine phosphorylation in UT-7/Epo cells. We performed a global and quantitative analysis of the tyrosine phosphorylated proteins after 4 hours of treatment with IM. To do so, we used the SILAC labeling method [24]. UT-7/Epo cells were cultured for at least 3 weeks with isotopically labeled Lys and Arg. We then verified that more than 95% Lys and Arg residues of each analyzed proteins were isotopically labeled. Heavy amino acids-labeled cells were then treated for 4 h with IM whereas cells labeled with light amino acids received DMSO alone. Proteins from treated and untreated cells were then mixed and digested with trypsin. Tyrosine phosphorylated peptides were immunoprecipitated and analyzed by mass spectrometry (MS). For each identified peptide, ratio of MS signal intensities for heavy to light forms allowed to determine

Table 1. List of proteins and identified peptides presenting a tyrosine phosphorylation modification after imatinib (IM) treatment in UT-7/Epo cells.

Protein names	Gene names	peptide	Ratio H/L	Position	Range
Amyloid-like protein 2	APLP2	MQNHGYENPTYK	0,47985	Y 755	0,43428–0,52542
Amyloid-like protein 2	APLP2	MQNHGYENPTYK	0,5596	Y 750	0,53448–0,58471
SHC-transforming protein 1	SHC1	EIFDDPSYVNVQNIDK	0,57833	Y 428	0,49184–0,66481
Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase 1	INPP5D	EKIYDFVK	0,67383	Y 865	0,62630–0,72135
Signal transducer and activator of transcription 5	STAT5	AVDGYVKPQIK	0,71666	Y 694	0,53393–0,81895
Mucin-1	MUC1	YVPPSSTDSPYEK	0,75444	Y 1238	0,63110–0,87778
Cyclin-dependent kinase 1	CDK1	IGEGTYGVVYKGR	0,77535	Y 19	0,54629–1,00440
Tyrosine-protein kinase Lyn	LYN	SIDNGGYISPR	0,84216	Y 193	0,81260–0,87172
Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 18	PTPN18	SAEEAPIYSK	0,85268	Y 389	0,83351–0,87185
Catenin delta-1	CTNND1	INGPQDHSIIYSTIPR	0,86045	Y 96	0,81945–0,90145
Alpha-enolase	ENO1	AAVPSGASTGIYEAIEIR	0,89205	Y 44	0,87500–0,90910
Non-receptor tyrosine-protein kinase TYK2	TYK2	IIAQAEGPCYIR	0,89579	Y 292	0,87173–0,93281
Schlafen family member 11	SLFN11	NADPIAKYIQK	0,92243	Y 740	0,75395–1,09090
Receptor-type tyrosine-protein phosphatase alpha	PTPRA	VVQEYIDAFSDYANFK	0,94168	Y 809	0,90195–0,98141
Serine/threonine-protein kinase PRP4 homolog	PRPF4B	ICDFGSASHVADNDITPYIVSR	0,94375	Y 849	0,93596–0,95257
Junctional adhesion molecule A	F11R	VIYSQPSAR	0,95872	Y 284	0,80503–1,11240
Glycogen synthase kinase-3	GSK3	GEPNVSYICSR	0,97317	Y 279	0,97190–0,97444
Elongation factor 1-alpha 1	EEF1A1	STTTGHIIYK	0,98889	Y 29	0,97503–1,00510
Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11	PTPN11	IQNTGDYYDIYGGEK	0,99527	Y 62	0,95104–1,03950
Tyrosine-protein kinase JAK2	JAK2	REVGDYQGIIHETEVIK	0,99782	Y 570	0,95137–1,02940
Mitogen-activated protein kinase 14	MAPK14	HTDDEMTGYVATR	1,00044	Y 182	0,95259–1,04820
Cyclin-dependent kinase 1	CDK1	IGEGTYGVVYK	1,01198	Y 15	0,99314–1,03860
Tyrosine-protein kinase HCK	HCK	VIDNEYTAR	1,01576	Y 411	0,93732–1,09420
Cyclin-dependent kinase 3	CDK3	IGEGTYGVVYK	1,0163	Y 15	1,00630–1,02170
Tyrosine-protein kinase Lyn	LYN	VIDNEYTAREGAK	1,02901	Y 397	0,98982–1,06820
Homeodomain-interacting protein kinase 1	HIKP1	AVCSTYIQR	1,05743	Y 352	1,03746–1,07660
Transgelin-2	TAGLN2	ANRGPAYGISR	1,06637	Y 8	0,98633–1,14640
Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1	DYRK1	IYQYIQR	1,14687	Y 321	1,06570–1,27760
Mitogen-activated protein kinase 3	MAPK3	IADPEHDHTGFITEYVATR	1,14715	Y 204	1,11940–1,17490

Table 1. Cont.

Protein names	Gene names	peptide	Ratio H/L	Position	Range
Mitogen-activated protein kinase 1	MAPK1	VADPDHDTGFITEYVATR	1,20773	Y 187	1,01550–1,39270
Tyrosine-protein kinase Yes	YES1	IIEDNEYTAR	1,2854	Y 426	1,15650–1,44170

A ratio H(eavy)/L(ight) < 0.5 is associated with a significant decrease in tyrosine phosphorylation of the indicated Y residue after IM treatment. At the opposite, a ratio H/L > 2 is associated with a significant increase in tyrosine phosphorylation of the indicated Y residue after IM treatment. All the peptides were at least identified in two different experiments. For each peptide, the range of ratio H/L represent the dispersion observed between the experiments.

doi:10.1371/journal.pone.0060961.t001

whether or not IM affected the phosphorylation of this peptide. Three independent experiments were performed and peptides identified and quantified in at least two experiments are reported in Table 1. As shown in this table, a single protein (APLP2) showed more than 2 fold change in tyrosine phosphorylation after IM treatment. Thus, IM treatment did not induce a global modification in tyrosine phosphorylation in UT-7/Epo cells. In particular, the phosphorylation of several Src family kinases (Lyn, Hck, Yes) was not modified by IM. Thus, it seems unlikely that IM mediates c-Kit degradation by inducing a global modification of protein phosphorylation on tyrosine residues.

The integrity of c-Kit ATP pocket is crucial for imatinib-induced internalization

We suspected that internalization was driven by direct interaction between imatinib and the ATP binding pocket of c-Kit. To test this hypothesis, we used a mutated form of c-Kit, the so called “gate keeper” mutant, which contains a T670I substitution within the ATP pocket. This mutation abolishes the sensitivity to imatinib by inducing a substantial deformation of the ATP pocket which prevents the binding of imatinib, while the multikinase inhibitor sorafenib retains a better access to the ATP pocket and an inhibitory activity to this mutant. [25,26,27].

The effects of imatinib on c-Kit expression were analyzed in the murine BaF-3 cell line transfected with human T670I c-Kit mutant or *wt*-c-Kit. As shown in Figure 7A, internalization of Kit by imatinib was detected in UT-7/Epo and *wt*-c-Kit BaF3 cells, but not in the T670I c-Kit mutant BaF-3 cells. Sorafenib used at 5 μ M was able to induce c-Kit internalization in the two cell types. In western blot experiments, we observed that IM was unable to decrease the expression of the mature form of T670I c-Kit mutant, while the *wt* form of the receptor decreased in UT-7/Epo or in *wt*-c-Kit BaF3 cells (Figure 7B). As expected, the expression of the mature form of T670I c-Kit mutant was down regulated in the presence of sorafenib. These data indicate that the accessibility of the ATP pocket is crucial for imatinib-induced c-Kit internalization process.

Discussion

In the present work, we have demonstrated that imatinib induces the down-regulation of the mature and functional form of c-Kit in the absence of SCF. The mechanism of TKI-induced c-kit down-regulation implicates both internalization and lysosomal degradation of the receptor. This effect is observed as long as the cells are exposed to the drugs and is reversible after TKI withdrawal. Our data suggests that the integrity and occupancy of the ATP pocket by TKI is required for initiation of c-Kit down-regulation.

Our main observation is that c-Kit interacting with imatinib in the absence of ligand could be processed for internalization. This is

consistent with the capacity of mutant kinase dead receptors to internalize. The kinetics of internalization upon SCF ligation or imatinib were different. While activated receptor upon ligand binding is rapidly internalized, the internalization of c-Kit by imatinib is slow suggesting that the mechanism could be quite different. Activation of the E3 ubiquitin ligase c-Cbl, is a key step for EGF-R or c-Kit endocytosis after ligand binding or active mutant c-Kit endocytosis, and their subsequent targeting to the lysosomal pathway after mono-ubiquitination [9,23,28]. The recruitment of c-Cbl to c-Kit requires the phosphorylation of tyrosine residues located close to the transmembrane domain (Y568 and Y760) and in the C-terminus part of the receptor (Y936) [9,28]. These tyrosine residues are phosphorylated by the receptor tyrosine kinase upon ligand binding, and subsequent receptor internalization is achieved when c-Cbl becomes phosphorylated by Src kinase family members [4,29,30,31]. Here, we found that c-Kit internalization induced by imatinib occurs while c-Kit kinase activity is abrogated, which may prevent the activation of c-Cbl and consequently delay the process.

Because the spectrum of TKI targets includes both membrane receptors like c-Kit and several intracellular kinases, we should ask whether the internalization of c-Kit is a side effect due to the inhibition of other intracellular kinases. To explore this hypothesis, we have analyzed the phosphotyrosine peptides in the UT-7/Epo cell line cultured with Epo before and after induction of c-Kit internalization with imatinib. We did not observe significant modifications of phosphotyrosine peptide content, including those corresponding to major signaling pathways downstream Epo receptor including the. STAT5 and ERK1/2 pathways. This is consistent with the fact that IM did not modify Epo-induced UT-7/Epo cell proliferation (Figure 1D). This demonstrates that imatinib does not induce a significant modification of the activity of most tyrosine kinases in these cells.

Our data support the idea that internalization could be initiated after the binding of imatinib to the ATP binding pocket. We used the T670I mutant c-Kit unable to bind imatinib and responsible for myeloproliferative disorder in mice and imatinib-resistant GIST in humans [26,32]. Indeed, up to 10 μ M imatinib was ineffective to block T670I mutant-driven cell proliferation, while kinase inhibitor sorafenib, which inhibits *wt* c-Kit at a concentration of 5 μ M efficiently reduced this proliferation [27,33 and our data not shown]. Sorafenib also efficiently improved response rate and overall survival in patients with metastatic renal cell carcinoma overexpressing *wt* c-Kit [34]. In our work, we show that both sorafenib and imatinib induced the down-regulation of *wt* c-Kit suggesting that internalization consecutive to targeting of the ATP binding pocket is a common mechanism for various TKI. By contrast, sorafenib but not imatinib could induce the internalization of c-Kit when mutated at T670 which exhibits a deformation of the ATP binding pocket previously shown to prevent the binding of

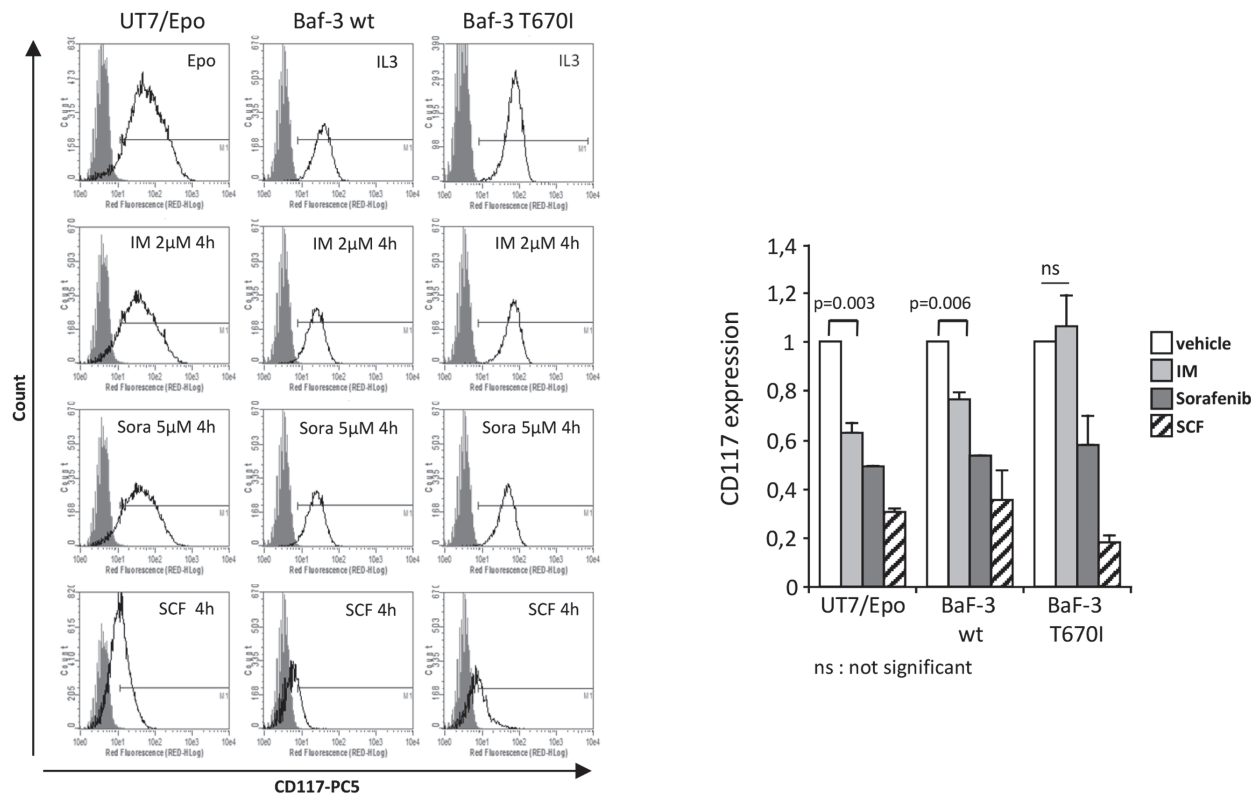
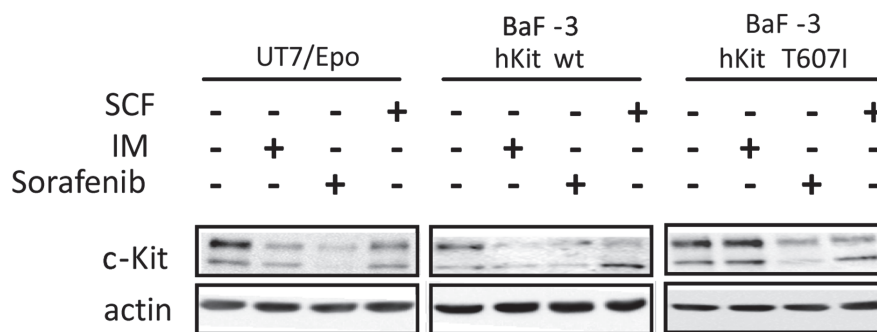
A**B**

Figure 7. The integrity of c-Kit ATP pocket is crucial for imatinib-induced internalization. UT-7/Epo, BaF-3 hKit WT and BaF-3 hKit T670I cultivated with Epo (1 UI/ml) or IL3 (1 ng/ml) were incubated 4 h with 2 μ M Imatinib or 5 μ M sorafenib or vehicle or stimulated 10 minutes with 50 ng/mL SCF. **A.** Cell surface expression of c-Kit by flow cytometry using CD117 antibody (black line) compared to isotypic antibody (grey line). Results were expressed as RFI of CD117 normalized to cells in control conditions. The results are the mean of three independent experiments. **B.** Western Blot analysis of cell lysates. Actin is used as loading control. Results are representative of three independent experiments. doi:10.1371/journal.pone.0060961.g007

imatinib. We conclude from these experiments that binding in the ATP pocket of c-kit is a prerequisite for subsequent initiation of the internalization process by TKI.

The remaining question is the consequence of imatinib binding on the overall conformation of the receptor. In 2004, Mol and colleagues [35] have shown that c-Kit, in the absence of ligand, may exist in two different pre-activated and auto-inhibited conformations. To further describe the auto-inhibited conformation, they generated a series of point mutations, and demonstrated

the importance of juxta-membrane domain for the stabilization of the protein. They also demonstrated that IM could disrupt the conformation thus abrogating the auto-inhibited state. We suspect that when released from auto-inhibition, the receptor should initiate its internalization process. This was confirmed by X-ray crystallography of c-Kit-imatinib complex showing that imatinib binds to a conformational inactive monomeric form of c-Kit. We suggest that this modification could expose an internalization specific motif that is normally buried in inactive receptors.

However, since internalization kinetics after TKI treatment is much slower than after SCF stimulation, it is likely that efficiency of this process is poor compared to the down-regulation mechanism involving c-Cbl after SCF stimulation.

Finally, imatinib-dependent c-Kit down-regulation drastically impacts on the rate of erythroblast maturation *in vitro*. Thus, c-Kit expression alone seems to be sufficient to delay the terminal differentiation of erythroid cells in the absence of SCF. Whether c-Kit could behave as a molecular adaptor in this process or is activated to low levels by a mechanism that remains to be determined deserves supplementary investigations.

In conclusion, our results describe the mechanism of long-term induction of c-Kit internalization by TKI. Prolonged down-regulation and degradation of c-Kit by imatinib may add to the rapid inhibitory effect of the drug on c-Kit tyrosine kinase activity in tumors in which overexpression of wt-c-Kit worsens the prognosis.

Supporting Information

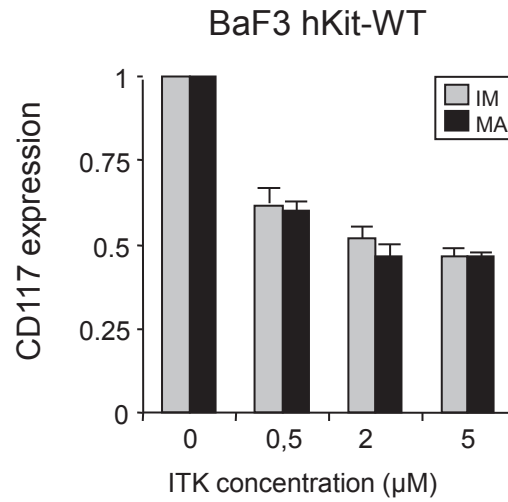
Figure S1 Imatinib or masitinib decreases cell surface expression of mature and functional c-Kit in BaF3 hKit WT and TF-1 cells. A and B. Cell surface expression of c-Kit.

References

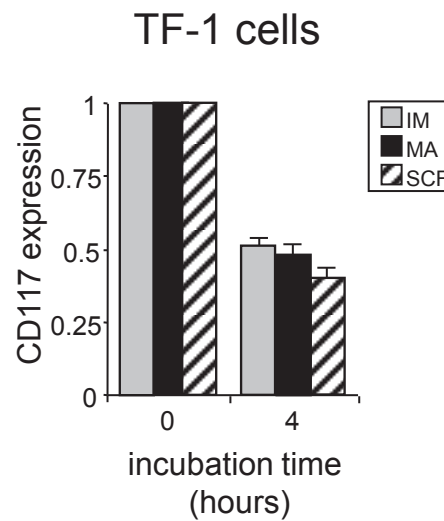
- Muta K, Krantz SB, Bondurant MC, Dai CH. (1995) Stem cell factor retards differentiation of normal human erythroid progenitor cells while stimulating proliferation. *Blood* 86: 572–80.
- Yuzawa S, Opatowsky Y, Zhang Z, Mandiyan V, Lax I, et al. (2007) Structural basis for activation of the receptor tyrosine kinase KIT by stem cell factor. *Cell* 130: 323–34.
- Orinska Z, Föger N, Huber M, Marschall J, Mirghomizadeh F, et al. (2010). I787 provides signals for c-Kit receptor internalization and functionality that control mast cell survival and development. *Blood* 116: 2665–75.
- Wilde A, Beattie EC, Lem L, Riethof DA, Liu SH, et al. (1999) EGF receptor signaling stimulates SRC kinase phosphorylation of clathrin, influencing clathrin redistribution and EGF uptake. *Cell* 96: 677–87.
- He YY, Huang JL, Gentry JB, Chignell CF (2003) Epidermal growth factor receptor down-regulation induced by UVA in human keratinocytes does not require the receptor kinase activity. *J Biol Chem* 278: 42457–65.
- Wang Q, Villeneuve G, Wang Z (2005) Control of epidermal growth factor receptor endocytosis by receptor dimerization, rather than receptor kinase activation. *EMBO Rep* 6: 942–8.
- Yee NS, Hsiao CW, Serve H, Vosseller K, Besmer P (1994) Mechanism of down-regulation of c-kit receptor. Roles of receptor tyrosine kinase, phosphatidylinositol 3'-kinase, and protein kinase C. *J Biol Chem* 269: 31991–8.
- Kitayama H, Kanakura Y, Furitsu T, Tsujimura T, Oritani K, et al. (1995) Constitutively activating mutations of c-kit receptor tyrosine kinase confer factor-independent growth and tumorigenicity of factor-dependent hematopoietic cell lines. *Blood* 85: 790–8.
- Masson K, Heiss E, Band H, Rönnstrand L (2006) Direct binding of Cbl to Tyr568 and Tyr936 of the stem cell factor receptor/c-Kit is required for ligand-induced ubiquitination, internalization and degradation. *Biochem J* 399: 59–67.
- Bandi SR, Brandts C, Rensinghoff M, Grundler R, Tickenbrock L, et al. (2009) E3 ligase-defective Cbl mutants lead to a generalized mastocytosis and myeloproliferative disease. *Blood* 114: 4197–208.
- Lennartsson J, Rönnstrand L. (2012) Stem Cell Factor Receptor/c-Kit: From Basic Science to Clinical Implications. *Physiol Rev* 92: 1619–49.
- Heinrich MC, Blanke CD, Druker BJ, Corless CL (2002) Inhibition of KIT tyrosine kinase activity: a novel molecular approach to the treatment of KIT-positive malignancies. *J Clin Oncol* 20: 1692–703.
- Growney JD, Clark JJ, Adelsperger J, Stone R, Fabbro D, et al. (2005) Activation mutations of human c-KIT resistant to imatinib mesylate are sensitive to the tyrosine kinase inhibitor PKC412. *Blood* 106: 721–4.
- Kosmider O, Denis N, Lacout C, Vainchenker W, Dubreuil P, et al. (2005) Kit-activating mutations cooperate with Spi-1/PU.1 overexpression to promote tumorigenic progression during erythroleukemia in mice. *Cancer Cell* 8: 467–78.
- Dubreuil P, Letard S, Ciufolini M, Gros L, Humbert M, et al. (2009) PLoS One. Masitinib (A61010), a potent and selective tyrosine kinase inhibitor targeting KIT. *4*: e7258.
- Zernati Y, De Sepulveda P, Féger F, Létard S, Kersual J, et al. (2003) Effect of tyrosine kinase inhibitor STI571 on the kinase activity of wild-type and various mutated c-kit receptors found in mast cell neoplasms. *Oncogene* 22: 660–4.
- Frisan E, Vandekerckhove J, de Thonel A, Pierre-Eugène C, Sternberg A et al. (2012) Defective nuclear localization of Hsp70 is associated with dyserythropoiesis and GATA-1 cleavage in myelodysplastic syndromes. *Blood* 119: 1532–42.
- Cox J, Mann M (2008) MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol* 26: 1367–72.
- Walrafen P, Verdier F, Kadri Z, Chrétien S, Lacombe C, et al. (2005) Both proteasomes and lysosomes degrade the activated erythropoietin receptor. *Blood* 105: 600–8.
- Verdier F, Walrafen P, Hubert N, Chretien S, Gisselbrecht S, et al. (2000) Proteasomes regulate the duration of erythropoietin receptor activation by controlling down-regulation of cell surface receptors. *J Biol Chem* 275: 18375–81.
- Rodal SK, Skretting G, Garred O, Vilhardt F, van Deurs B, et al. (1999) Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Mol Biol Cell* 10: 961–974.
- Subtil A, Gaidarov I, Kobylarz K, Lampson MA, Keen JH, et al. (1999) Acute cholesterol depletion inhibits clathrin-coated pit budding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 6775–6780.
- Zeng S, Xu Z, Lipkowitz S, Longley JB (2005) Regulation of stem cell factor receptor signaling by Cbl family proteins (Cbl-b/c-Cbl). *Blood* 105: 226–32.
- Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, et al. (2002) Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics* 1: 376–86.
- Tamborini E, Priel S, Negri T, Lagonigro MS, Miselli F, et al. (2006) Functional analyses and molecular modeling of two c-Kit mutations responsible for imatinib secondary resistance in GIST patients. *Oncogene* 25: 6140–6.
- Tamborini E, Bonadiman L, Greco A, Albertini V, Negri T et al. (2004) A new mutation in the KIT ATP pocket causes acquired resistance to imatinib in a gastrointestinal stromal tumor patient. *Gastroenterology* 127: 294–9.
- Guo T, Agaram NP, Wong GC, Hom G, D'Adamo D et al. (2007). Sorafenib inhibits the imatinib-resistant KIT670I gatekeeper mutation in gastrointestinal stromal tumor. *Clin Cancer Res* 14: 3204–15.
- Waterman H, Levkowitz G, Alroy Y, Yarden Y (1999) The RING finger of c-Cbl mediates desensitization of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 274: 22151–4.
- Sun J, Pedersen M, Bengtsson S, Rönnstrand L (2007) Grb2 mediates negative regulation of stem cell factor receptor/c-Kit signaling by recruitment of Cbl. *Exp Cell Res* 313: 3935–42.
- Padron D, Sato M, Shay JW, Gazdar AF, Minna JD, et al. (2007) Epidermal growth factor receptors with tyrosine kinase domain mutations exhibit reduced Cbl association, poor ubiquitylation, and down-regulation but are efficiently internalized. *Cancer Res* 67: 7695–702.
- Broudy VC, Lin NL, Liles WC, Corey SJ, O'Laughlin B, et al. (1999) Signaling via Src family kinases is required for normal internalization of the receptor c-Kit. *Blood* 94: 1979–86.
- Bosbach B, Deshpande S, Rossi F, Shieh JH, Sommer G, et al. (2012) Imatinib resistance and microcytic erythrocytosis in a KitV558A/T669I/+ gatekeeper-mutant mouse model of gastrointestinal stromal tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 2276–83.
- Heinrich MC, Marino-Enriquez A, Presnell A, Donsky RS, Griffith DJ, et al. (2012) Sorafenib inhibits many kinase mutations associated with drug-resistant gastrointestinal stromal tumors. *Mol Cancer Ther* 11: 1770–80.

34. Zhang HL, Zhu Y, Qin XJ, Wang CF, Yao XD et al. (2012) c-KIT: Potential Predictive Factor for the Efficacy of Sorafenib in Metastatic Renal Cell Carcinoma With Sarcomatoid Feature. *Clin Genitourin Cancer* 12: 00174–7.
35. Mol CD, Dougan DR, Schneider TR, Skene RJ, Kraus ML, et al. (2004) Structural basis for the autoinhibition and STI-571 inhibition of c-Kit tyrosine kinase. *J Biol Chem* 279: 31655–63.
36. Komatsu N, Nakauchi H, Miwa A, Ishihara T, Eguchi M, et al. (1991) Establishment and characterization of a human leukemic cell line with megakaryocytic features: dependency on granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin 3, or erythropoietin for growth and survival. *Cancer Res* 51: 341–8.
37. Yang Y, Létard S, Borge L, Chaix A, Hanssens K, et al (2010) Pediatric mastocytosis-associated KIT extracellular domain mutations exhibit different functional and signaling properties compared with KIT-phosphotransferase domain mutations. *Blood* 116: 1114–23.
38. Collins MK, Downward J, Miyajima A, Maruyama K, Arai K, et al (1988) Transfer of functional EGF receptors to an IL3-dependent cell line. *J Cell Physiol* 137: 293–8.

A



B



Imatinib or masitinib decreases cell surface expression of mature and functional c-Kit in BaF3 hKit WT and TF-1 cells. A and B. Cell surface expression of c-Kit. Murine BaF3 were stably transfected with a human c-Kit WT and incubated with indicated concentrations of imatinib (IM) (grey bars) or masitinib (MA) (black bars) for 4 h (A). TF-1 erythroid cell line was incubated with 2 μ M of imatinib (IM) (grey bars) or 2 μ M of masitinib (MA) (black bars) for 4 h (B). C-Kit cell surface expression was determined by flow cytometry. Results were expressed in Ratio of median Fluorescence Intensity (RFI), and the values were normalized to untreated cells. Results are the mean of at least three independent experiments.

Résultats II

Devenir du nucléole au cours de la différenciation
érythroïde normale et pathologique des
syndromes myélodysplasiques de faible risque

I. Contexte Scientifique

A. Structure et morphologie du nucléole

Depuis de nombreuses années, le nucléole se définit comme étant le lieu de la biogenèse des ribosomes.

Au début des années 2000, des études protéomiques, ont permis de révéler la présence de plus de 700 protéines différentes dans le nucléole. La majorité d'entre elles sont des protéines impliquées dans la biogenèse du ribosome (environ 35%), mais le nucléole renferme également des protéines impliquées dans le métabolisme des ARNm, la structure de la chromatine, le cycle cellulaire, la réparation de l'ADN ou encore dans la dégradation protéique, ainsi que des protéines chaperones. De façon intéressante, 16% des protéines identifiées n'ont pas de fonction encore définie (Scherl *et al.*, 2002) (Andersen *et al.*, 2002) (Andersen *et al.*, 2005) (**Figure 30**).

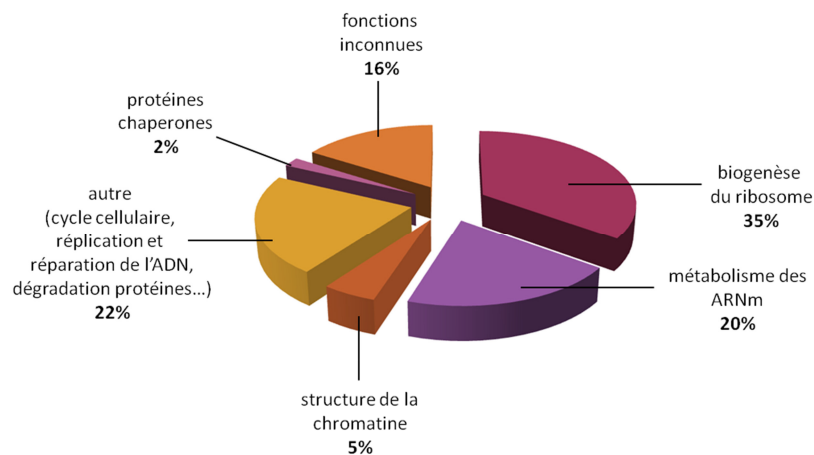


Figure 30 : Répartition des protéines nucléolaires selon leurs fonctions (d'après Couté *et al.*, 2006)

Le nucléole est composé d'environ 700 protéines, impliquées dans différents processus biologiques.

Ces résultats suggèrent donc que, outre la biogenèse des ribosomes, le nucléole est le lieu de diverses fonctions cellulaires.

La première description du nucléole fut faite par Fontana en 1781. Ce dernier décrit sa découverte comme « un corps oviforme ayant une tâche en son centre ». Cinquante ans plus tard, Montgomery et Valentin nomme cette zone « nucléole ». Au cours du XX^{ème} siècle, l'évolution des techniques de microscopie, et notamment l'invention de la microscopie électronique, permet de déterminer l'ultra-structure du nucléole, et de le définir comme une région particulière du noyau.

En microscopie électronique, le nucléole apparaît comme un domaine nucléaire non délimité par une membrane. Il est composé de trois sous-domaines, reconnaissables par leur différence de densité aux électrons (**Figure 31**). La « matrice » du nucléole, appelé Composé Granulaire (CG), compose de granules de 15 μm à 20 μm , enchâsse les Centres Fibrillaires (CF) et les Composants Fibrillaires Denses (CFD). Les CF sont des régions plutôt claires et de tailles variables, entre 0.1 μm et 1 μm . Les CFD ont un aspect plus contrasté, plus dense aux électrons, et enchâssent les CF. Généralement, le nucléole est entouré d'hétérochromatine (Hernandez-Verdun and Louvet, 2004).

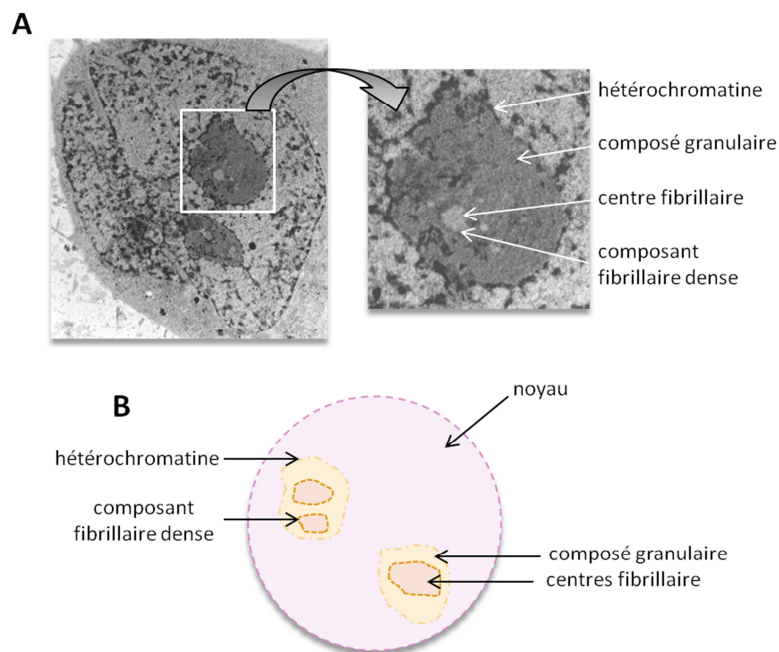


Figure 31 : Structure nucléolaire

A. Noyau en microscopie électronique à gauche, et agrandissement d'un de ses deux nucléoles à droite. **B.** Représentation schématique d'un nucléole en conditions physiologiques.

Une cellule diploïde humaine normale contient à peu près 400 gènes ribosomiques répétés en tandem. Les loci de ces gènes sont localisés dans les régions sub-téломériques des chromosomes acrocentriques 13, 14, 15, 21 et 24 (Raska, 2004). C'est autour de ces régions géniques, appelées NOR (Nucleolar Organizer Region), que le nucléole se forme. Chez l'Homme, plusieurs NORs coopèrent afin de former un nucléole. Il est à noter que toutes les copies des gènes ribosomiques ne sont pas actives. En effet, des cellules en phase exponentielle de croissance, nécessitant donc une forte production de ribosomes, n'expriment seulement que 60% de leurs gènes ribosomiques (Conconi *et al.*, 1989).

Le nucléole est intimement lié à la synthèse des ribosomes, et ses trois compartiments supportent des étapes précises de cette maturation. En 1984, Scheer et Rose, montrent que l'ARN polymérase I s'accumule au niveau du CF (Scheer and Rose, 1984). Dix ans plus tard, Shaw *et al.* révèle que l'ADNr est majoritairement localisé au niveau de la chromatine qui entoure le nucléole, mais en retrouve également, en plus petites quantités, dans les CF (Shaw *et al.*, 1995). Cependant, la localisation précise des étapes de maturation des ARNr et d'assemblage des sous-unités du ribosome n'est toujours pas clairement élucidée. En effet, pour certains, seul le CF héberge la transcription des ARNr (Thiry *et al.*, 2000). Pour d'autres, le CF est le lieu de stockage des gènes ribosomiques, et la synthèse des ARNr se fait à l'interface du CF et du CFD (Koberna *et al.*, 2002) (Derenzini *et al.*, 2006) (Raska *et al.*, 2006). Quoiqu'il en soit, le facteur de transcription UBF, trans-activateur de l'ARN polymérase I, indispensable à la transcription des ARNr (Voit *et al.*, 1995), est un marqueur spécifique du CF.

La maturation des ARNr se situe quant à elle, successivement dans le CFD puis dans le CG (Puvion-Dutilleul *et al.*, 1991) (Shaw *et al.*, 1995).

Le nucléole est donc une structure tripartite dynamique et modulable. En effet, l'inhibition de l'ARN polymérase I par une faible dose d'actinomycine D, se traduit par une réorganisation structurale du nucléole. Après traitement, on observe une ségrégation claire du CF, du CFD et du CG (Shav-Tal *et al.*, 2005) (**Figure 32**).

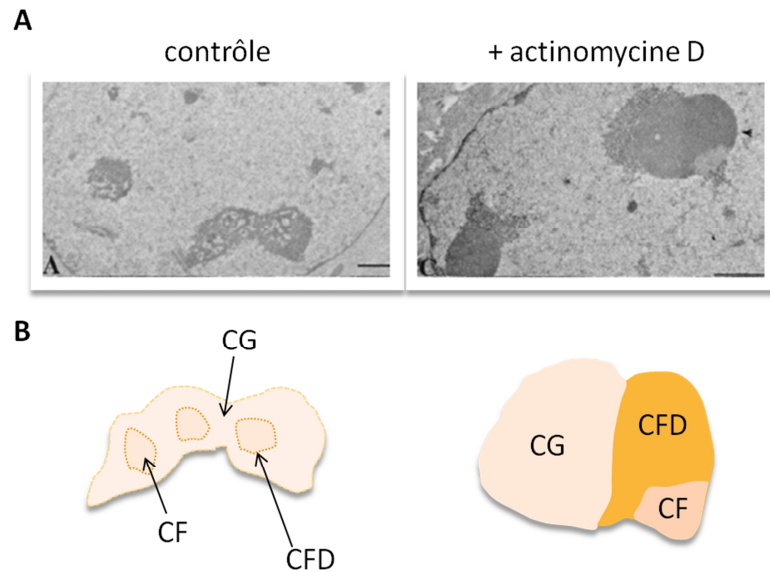


Figure 32 : Nucléoles en microscopie électronique (d'après Dousset *et al.*, 2000)

A. Microscopie électronique de nucléoles en condition physiologique (gauche) ou après traitement à l'actinomycine D (droite). **B.** Représentation schématique de la ségrégation des domaines nucléolaires après inhibition de l'ARN polymérase I par traitement à l'actinomycine D.

La structure nucléolaire reflète donc l'activité traductionnelle d'une cellule, et dans certaines conditions, physiologiques ou pathologiques, cette activité traductionnelle est altérée.

B. Nucléole et défaut de biogenèse du ribosome

En 2010, l'équipe de P-E Gleizes a étudié l'impact de l'inhibition des protéines de la sous-unité 40S du ribosome sur la morphologie nucléolaire. Les résultats obtenus, par des marquages immunofluorescents de la fibrillarine, protéine constitutive des CFD, montrent que la répression de l'expression de la plupart des Rps induit un aspect irrégulier du nucléole, mais néanmoins proche de la structure normale. Toutefois, lorsque la protéine Rps16 n'est pas exprimée, le CFD se condense et se relocalise en périphérie du nucléole (O'Donohue *et al.*, 2010). Cet aspect est comparable à celui obtenu lorsque les cellules sont traitées par l'actinomycine D (Dousset *et al.*, 2000).

Des études d'immunofluorescences ont montré que l'inhibition partielle de l'expression des protéines Rps14 ou Rps19 n'engendrent pas de modifications de localisation du CG (Dutt *et al.*, 2011) ou du CFD (Choesmel *et al.*, 2007). Cependant, des analyses de microscopie électronique ont permis de mettre en évidence que les patients atteints d'ADB et porteurs d'une mutation touchant le gène *Rps19*, présentaient des CFD nettement plus compacts que les CFD de patients atteints d'ADB mais ne présentant aucune mutation de gènes codant des protéines ribosomiques. (Choesmel *et al.*, 2007). Enfin, Fumagalli *et al.* a montré en 2009, que l'absence de la protéine Rps6 n'induit pas de relocalisation du CFD (Fumagalli *et al.*, 2009).

Ces résultats montrent donc qu'un stress ribosomique n'engendre pas systématiquement un phénotype nucléolaire aberrant et que celui-ci est variable selon l'origine du stress.

C. Nucléole et cycle cellulaire

La mitose est une phase critique du cycle cellulaire durant laquelle la biogenèse des ribosomes est arrêtée. En effet, la synthèse et la maturation des ARNr sont interrompues en prophase, puis la transcription des ADNr et la maturation des particules pré-ribosomiques sont progressivement réactivées en fin de télophase, correspondant à la séparation des deux cellules filles et à la reformation du noyau. Pendant la mitose, le nucléole se désintègre donc puis est reformé.

Grâce à des études quantitatives d'imagerie photonique, l'équipe de Lamond a démontré que la dissociation du nucléole suit une cinétique bien précise (Leung *et al.*, 2004). Au cours de la prométaphase, les CF se désintègrent en premier puis sont rapidement suivis par la dissociation des CFD. De plus, au cours de cette période, de petites particules ribonucléoprotéiques, appelé NDF (Nucleolar Derived Foci) s'assemblent. Celles-ci apparaissent comme étant un lieu de stockage inerte renfermant les pré-ARNr (Dundr and Olson, 1998) (Dundr *et al.*, 2000) ainsi que des protéines nucléolaires telles que la fibrillarine ou la nucléophosmine (Ochs *et al.*, 1985) (Thiry *et al.*, 2009).

La transition prométaphase/métaphase se caractérise par l'agrégation de nombreuses protéines ribosomiques, telles que la fibrillarine, à la périphérie des chromosomes, formant ainsi une gaine autour des chromosomes et pouvant permettre la répartition homogène des protéines nucléolaires (Hernandez-Verdun and Gautier, 1994) (Savino *et al.*, 2001) (Hernandez-Verdun and Roussel, 2003).

La nucléogénèse post-mitotique se déroule autour des NORs et s'étend de la télophase jusqu'à la phase G1 du cycle cellulaire, après réactivation de l'ARN polymérase I. Pendant la première partie de la télophase, lorsque les NDF disparaissent, de nouvelles structures ribonucléoprotéiques, appelées PNB (Pre-Nucleolar Bodies) apparaissent. Celles-ci renferment des protéines structurales du nucléole telles que la nucléophosmine (NPM1/B23) (Ochs *et al.*, 1985) (Fomproix *et al.*, 1998) (Angelier *et al.*, 2005) ainsi que des pré-ARNr (Dousset *et al.*, 2000) (Dundr *et al.*, 2000) et participent à la reformation de nucléoles fonctionnels (Carron *et al.*, 2012). Il est à noter que la fibrillarine, protéine représentative du CFD n'est pas présente dans ces structures éphémères (Muro *et al.*, 2010).

Les PNBs ont une composition protéique variable et participent séquentiellement dans la biogénèse des ribosomes. En effet, les PNBs composés de protéines impliquées précocement dans la maturation des ribosomes disparaissent avant les PNBs composés de protéines impliquées tardivement dans la maturation des ribosomes. Au sein d'un PNB, les protéines sont transférées vers le nucléole selon leur ordre d'implication dans la maturation des ribosomes (Savino *et al.*, 1999) (Savino *et al.*, 2001).

D. Nucléole et différenciation érythroïde

Les études morphologiques du nucléole sur des cellules érythroïdes en différenciation sont peu nombreuses et assez anciennes.

Néanmoins, il a été montré que la taille du noyau et du nucléole diminue de façon proportionnelle en fin de différenciation érythroïde. En effet, une étude menée sur des érythroblastes d'embryons de poulet, montre qu'en fin de maturation, lorsque les cellules sont de petite taille, les nucléoles s'apparentent à des « micronucléoles » inactifs, reflétant l'inhibition irréversible de la synthèse d'ARNr (Likovský *et al.*, 1994). De même, les érythroblastes issus de souris adultes ou nouveau-nées, présentent une relation étroite

entre la taille du noyau et celle des nucléoles. De plus, il apparaît qu'un noyau de grande taille renferme plus de nucléoles qu'un noyau de petite taille (Sasaki *et al.*, 1983). Koury *et al.* a également montré, que des érythroblastes murins immatures, infectés avec le virus de Friend (permettant la différenciation cellulaire terminale) perdent leurs nucléoles en phase tardive de différenciation (Koury *et al.*, 1988).

Enfin, Chelidze *et al.* a étudié la morphologie du nucléole d'érythroblastes de foie fœtaux murins et a observé que les CF des érythroblastes basophiles et des érythroblastes polychromatophiles sont très étendus et situés en bordure du nucléole. En fin de différenciation, quand la chromatine se condense et que le noyau devient pycnotique, il observe que la taille des CG est fortement diminuée (Chelidze *et al.*, 1984).

A ce jour, aucune analyse morphologique des nucléoles n'a été réalisée au cours de la différenciation des érythroblastes humains normaux.

II. Introduction de l'étude

Au cours de la différenciation érythroïde terminale, les cellules diminuent de taille, leurs noyaux se condensent, jusqu'à être expulsés afin de donner naissance aux hématies. Au cours de ces dernières étapes de maturation, la synthèse protéique, assurée par le ribosome, est réduite. Le nucléole, compartiment nucléaire spécifique, est le lieu de synthèse et des premières étapes de la maturation de ce complexe ribonucléoprotéique.

Nous avons analysé de manière qualitative et quantitative la morphologie du nucléole par des études de microscopie électronique ainsi que par des marquages immunofluorescents de la protéine NPM1, représentative du CG. De plus, nous avons cherché à corréliser les observations faites sur la morphologie nucléolaire, avec le stade de différenciation érythroïde, la prolifération cellulaire ainsi que la taille des cellules.

III. Matériel et méthode

A. Culture cellulaire

Une partie de cette étude a été réalisée sur la lignée cellulaire HeLa (ATCC® CRL-13011). Ces cellules sont cultivées en milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) supplémenté avec 10% de SVF (Sérum de Veau Fœtal), et avec 1% de pénicilline et streptomycine. Afin d'analyser l'impact d'un stress ribosomique sur la morphologie nucléolaire, nous avons traité les cellules avec 5nM d'actinomycine D (Calbiochem, Merk Biosciences, Darmstadt, Allemagne) pendant 4h.

Nous avons également utilisé différents types de prélèvements issus de donneurs sains ou de patients porteurs d'un SMD de faible risque. Les échantillons normaux sont issus de couches leuco-plaquettaires, de cytophères réalisées après mobilisation des progéniteurs médullaires par le G-CSF en vue d'une allogreffe de cellules souches périphériques, et de sang de cordon ombilical, issus de donneurs volontaires.

Les progéniteurs hématopoïétiques sont triés sur le marqueur CD34⁺ à l'aide du système MidiMacs (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Allemagne), à partir des cellules mononucléées isolées après FICOLL.

Par la suite, la culture liquide des cellules érythroïdes se déroule en deux phases. Au cours de la première phase d'amplification, les cellules sont cultivées en milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium), supplémenté avec 15% de BIT (BSA-Insuline-Transferrine – StemCell Technologies) et avec 1% de pénicilline et streptomycine, auquel sont rajoutés 100ng/mL de SCF, 40ng/mL d'IGF (Insulin-like Growth Factor) 1, 1U/mL d'IL (Interleukine) 3 et 10ng/mL d'IL6. 1μM de dexaméthasone est également ajouté au milieu pendant les premiers jours de culture. La deuxième phase de différenciation est initiée à partir du dixième jour de culture, en remplaçant ces cytokines par 1U/mL d'EPO et 40ng/mL d'IGF1.

Tout au long de cette culture, les cellules sont conservées à une densité de 8.10^5 cellules/mL. L'état de différenciation des cellules est suivi tous les jours par une analyse

cytologique réalisée sur une lame de cytocentrifugation colorée au May-Grünwald Giemsa (MGG).

B. Cytométrie en flux

La différenciation érythroïde est également suivie en cytométrie en flux sur l'expression du récepteur de la transferrine (CD71), et du marqueur érythroïde membranaire, la glycophorine A (GPA, CD235a).

Le suivi de la taille des cellules a également été réalisé en cytométrie en flux, à l'aide de la médiane du paramètre FS (Foward Scatter), après fenêtrage des cellules vivantes.

C. Détection de la protéine NPM1 en immunofluorescence

L'étude du composé granulaire a été réalisée grâce à un marquage en immunofluorescence de la protéine nucléolaire NPM1.

Les cellules sont fixées en méthanol pendant 10 minutes à -20°C, puis réhydratées en PBS (Phosphate Buffered Saline) 1X, et perméabilisées en Triton X-100 0.5% pendant 5 minutes dans la glace. Le blocage est réalisé en tampon de saturation SSC (Saline-Sodium-Citrate – 0.15M NaCl ; 15mM citrate de sodium – pH7) contenant 3% de BSA (Bovin Serum Albumin), et 0.1% de Tween pendant 30 minutes à température ambiante. Après 4 lavages en PBS 1X, l'anticorps primaire dirigé contre la protéine NPM1, dilué au 1/400^{ème} en tampon de saturation, est incubé pendant 1h à température ambiante, puis l'anticorps secondaire, dilué au 1/500^{ème} en tampon de saturation, est incubé 1h à température ambiante à l'abri de la lumière. Après lavage, les cellules sont mises en milieu de montage fluoromount-G contenant du DAPI (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA) et lutées.

D. Analyse des marquages immunofluorescents de NPM1 et reconstruction des nucléoles en 3D

L'acquisition des images est réalisée sur le microscope confocal Spinning Disk (Leica, Wetzlar, Allemagne). Pour chaque champ analysé, plusieurs images, dans la profondeur de

l'échantillon (tous les 0,4 μm), ont été prises afin de pouvoir réaliser une reconstitution 3D avec le logiciel Imaris (Bitplane, Scientific Solutions, Zurich, Suisse). La quantification des surfaces et des volumes des marquages immunofluorescents, a été réalisée sur un nombre moyen de 60 cellules par condition.

Le calcul de nombre de cellules ayant un marquage NPM1 a été réalisé à l'aide du logiciel de traitement d'image Image J (Wayne Rasband, National Institut of Health, USA) sur un nombre moyen de 260 cellules par condition.

E. Microscopie électronique

Après cytocentrifugation, les cellules érythroïdes cultivées sont fixées pendant 30 minutes à température ambiante en glutaraldéhyde 3%. Après lavages en PBS 1X, les échantillons sont conservés à 4°C et déposés à la plateforme d'imagerie électronique de l'Institut Cochin. Les échantillons sont alors inclus en résine de type EPON puis des coupes de 80nm sont réalisées à l'aide de l'ultramicrotome Reichert Ultracut S (Leica) et montées sur des grilles de nickel de 200 mesh.

L'acquisition d'images est effectuée sur le microscope électronique à transmission JEOL 1011 (Jeol Europe, Croissy-sur-Seine, France), et les images sont analysées par le logiciel DigitalMicrograph (Gatan.INC, Pleasanton, USA).

IV. Résultats et discussion

A. Morphologie du nucléole dans les cellules HeLa traitées à l'actinomycine D

A faible dose, l'actinomycine D induit un stress nucléolaire, par inhibition de l'ARN polymérase I. Ce stress se caractérise par la ségrégation des domaines structuraux du nucléole (Shav-Tal *et al.*, 2005).

1. Microscopie électronique

Comme le montrent les images représentatives de microscopie électronique à fort grossissement (25000X pour l'image de cellules non traitées et 40000X pour l'image de cellules traitées à l'actinomycine D) de la **Figure 33A**, un traitement de 5nM d'actinomycine D pendant 4h induit une réorganisation nucléolaire. En effet, en condition contrôle, nous pouvons observer que le nucléole présente un CG renfermant trois CF, eux-mêmes entourés de CFD. Lorsque l'activité transcriptionnelle de l'ARN polymérase I est inhibée, nous constatons une ségrégation des domaines nucléolaires. En effet, les CF se condensent en périphérie du nucléole et ne sont plus entourés des CFD, eux-mêmes agrégés en périphérie nucléolaire.

De plus, lorsque les images sont réalisées à plus faible grossissement (3000X pour l'image de cellules non traitées et 6000X pour l'image de cellules traitées à l'actinomycine D), il apparaît que les cellules contrôles présentent des nucléoles moins denses aux électrons que les cellules traitées à l'actinomycine D (**Figure 33A**).

2. Immunofluorescence de la protéine NPM1

Par la suite, nous avons réalisé des marquages immunofluorescents de la protéine NPM1, représentative du CG, qui définit la « matrice » nucléolaire.

Comme le montre la **Figure 33B**, les marquages immunofluorescents des cellules contrôles sont plus grands que les marquages des cellules traitées à l'actinomycine D, qui paraissent également plus condensés.

La reconstitution 3D de ces images, avec le logiciel d'analyse Imaris, ainsi que l'analyse des données recueillies, nous a permis de montrer, de manière quantitative, que la surface et le volume des CG après traitement à l'actinomycine D sont significativement réduits. De plus, nous observons également que le nombre de nucléole par cellule est légèrement, mais significativement, augmenté (**Figure 33 C**).

Ces analyses montrent donc, qu'en réponse à un stress induit par l'arrêt de la transcription des ADN_r, le nucléole subit des changements morphologiques importants. La

ségrégation des domaines constituant le nucléole, visible en microscopie électronique, se traduit, en microscopie photonique, par la réduction de taille et de volume du CG.

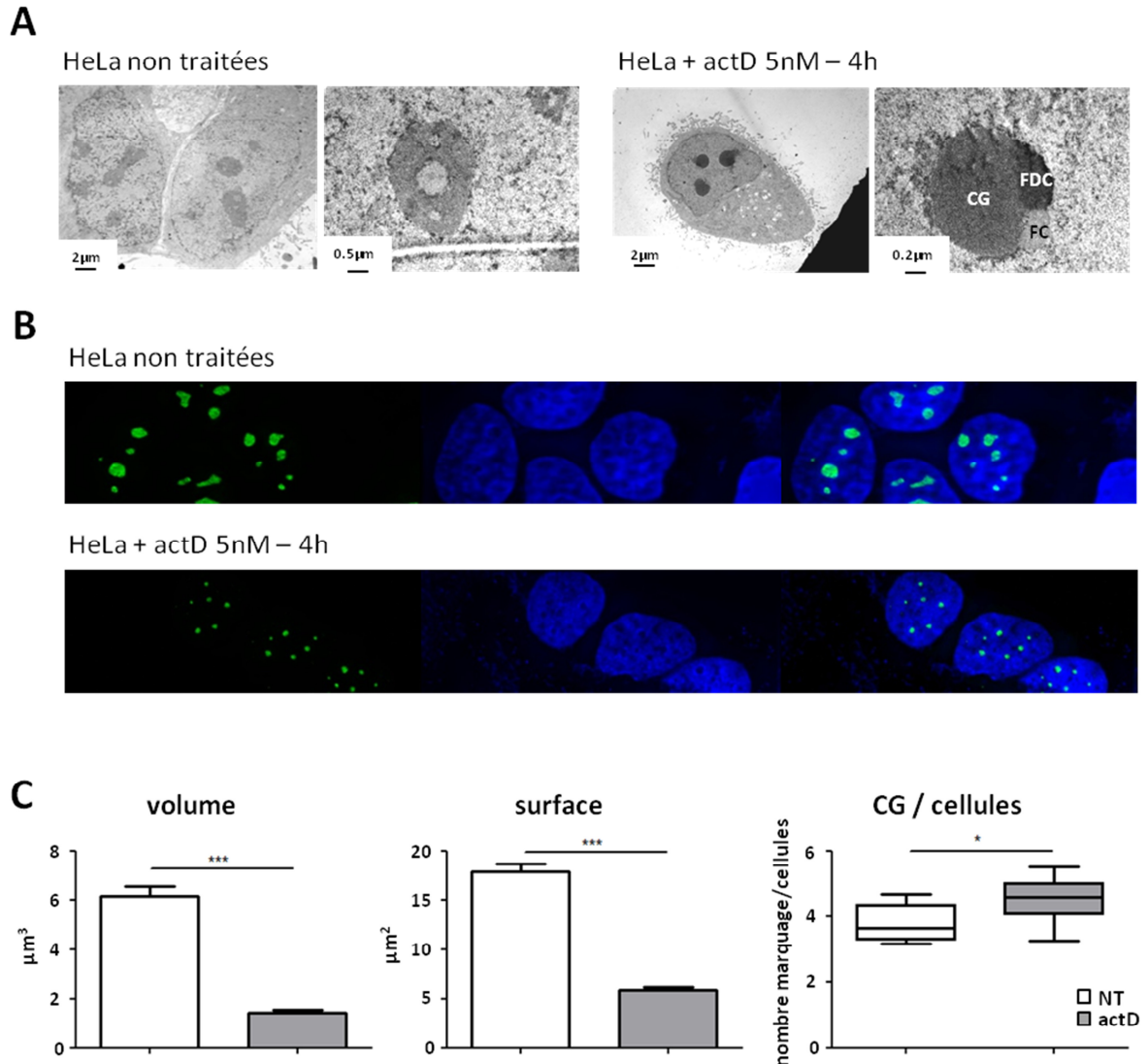


Figure 33 : Réorganisation des domaines structuraux du nucléole

A. Microscopie électronique sur des cellules HeLa contrôles (gauche) ou traitées à l'actinomycine D (droite). L'inhibition de la transcription des ARNr par un traitement de 5nM d'actinomycine D pendant 4h, induit une ségrégation des domaines structuraux du nucléole. **B.** Marquages immunofluorescents de la protéine NPM1 sur des cellules HeLa contrôles ou traitées à l'actinomycine D. **C.** Analyse quantitative de la ségrégation des domaines nucléolaires des cellules HeLa contrôles ou traitées à l'actinomycine D. La réorganisation nucléolaire induite par l'actinomycine D se traduit par une diminution significative du volume, de la surface des CG du nucléole ainsi que du nombre de nucléoles par cellule. Ces analyses quantitatives ont été réalisées grâce au le logiciel de reconstitution 3D Imaris.

En outre, il semble que les cellules traitées à l'actinomycine D présentent un nombre de marquages NPM1 plus élevé que les cellules contrôles (**Figure 33C**). Ces structures supplémentaires pourraient être des NDF. En effet, il a été montré qu'en réponse à une faible dose d'actinomycine D, les cellules HeLa forment des NDF, entre autre constitués de la protéine NPM1 (Zharskaia and Zatsepina, 2005).

Ceci reste néanmoins à confirmer par la mise en évidence d'une colocalisation entre la protéine NPM1 et des pré-ARNr par exemple.

B. Evolution de la morphologie des nucléoles au cours de la différenciation érythroïde normale

Lors des dernières étapes de la différenciation érythroïde, le nombre de divisions et la taille des cellules diminuent, et les noyaux se condensent jusqu'à être expulsés. Pendant cette période de changements morphologiques, la synthèse protéique est ralentie.

Nous avons étudié la morphologie des nucléoles au cours de ces différentes étapes.

Nous avons analysé six cultures de progéniteurs érythroïdes normaux. Les résultats obtenus sur une culture représentative, issue de sang de cordon (N2, **Tableau 3**), seront présentés.

Les cellules érythroïdes normales sont cultivées comme indiqué dans la **Figure 34A**. Au lendemain du tri des progéniteurs hématopoïétiques, le marquage en cytométrie de flux de la protéine de surface CD34 montre une pureté de 94%. Comme le montre la **Figure 34B**, au 5^{ème} jour de culture, 80% des cellules n'expriment ni le marqueur CD71 ni le marqueur CD235a. Au fur et à mesure de la différenciation érythroïde, les cellules acquièrent le marqueur CD71 (51% de cellules positives au 8^{ème} jour de culture et 70% au 12^{ème}) puis le marqueur CD235a (2% de cellules positives au 8^{ème}, 16.5% au 12^{ème} puis 83% et 95.6% aux 16^{ème} et 19^{ème} jours, respectivement) et enfin perdent le marqueur CD71 (12.2% de cellules positives au 16^{ème} jour et 0.9% au 19^{ème} jour) (**Figure 34B**).

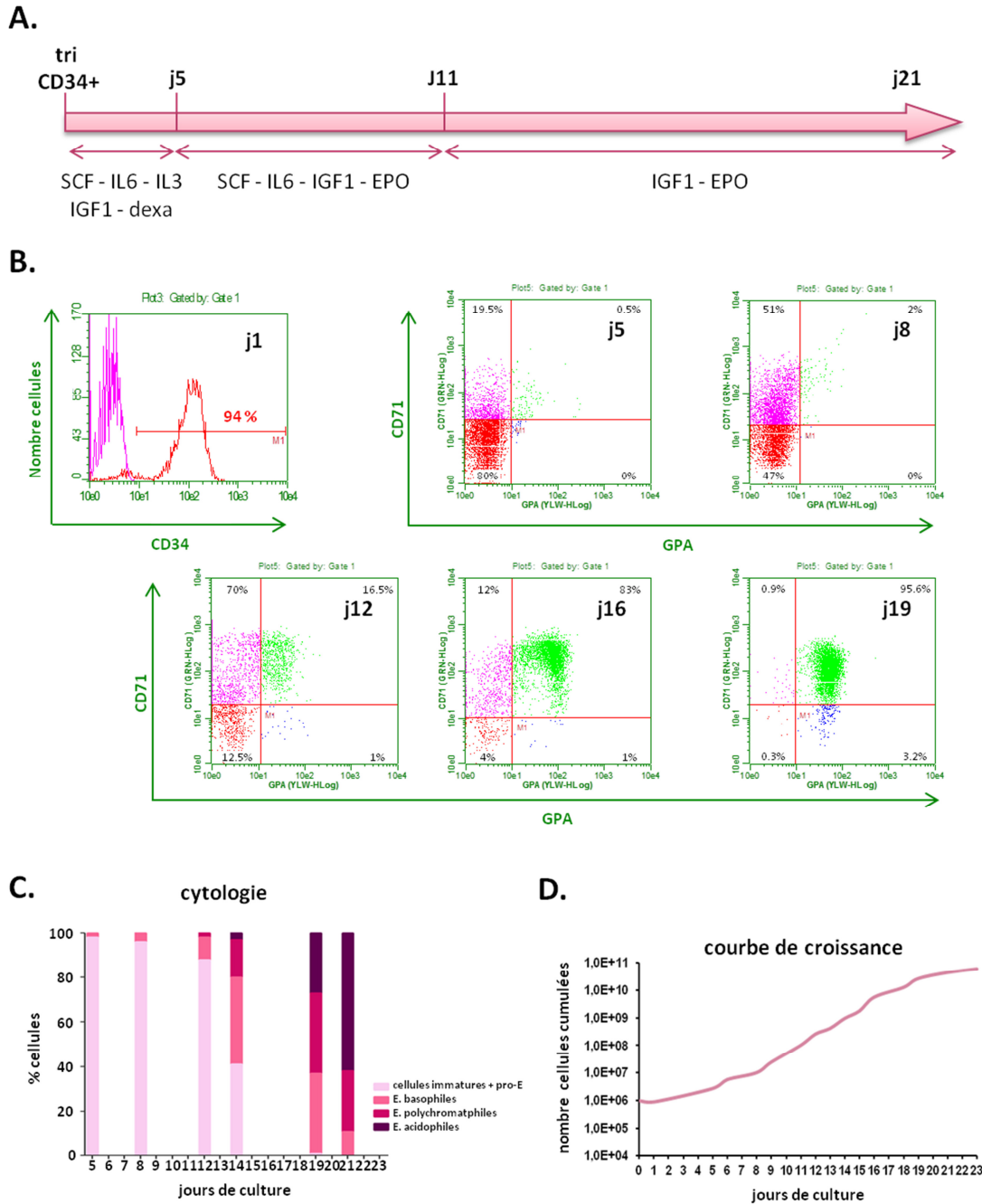


Figure 34 : Suivi d'une culture de progéniteurs érythroïdes humains normaux

A. Conditions de culture et cytokines utilisées. **B.** Profil de cytométrie en flux ; le marquage CD34 un jour après le tri nous permet de vérifier la qualité de la purification de cellules, et les marquages CD71 et GPA nous permettent de suivre la différenciation érythroïde. **C.** Décompte cytologique sur cytocentrifugation colorée au MGG. **D.** Courbe de croissance cellulaire ; l'ordonnée représente le nombre cumulé de cellules.

Le décompte cytologique des différentes populations érythroïdes après coloration des cellules au MGG (**Figure 34C**) montre qu'au fur et à mesure de la culture, le pourcentage de proérythroblastes diminue au profit de l'augmentation du pourcentage de cellules matures. En effet, aux 5^{ème} et 8^{ème} jours de culture, on décompte respectivement 98% et 96% de proérythroblastes, contre 2% et 4% d'érythroblastes basophiles. A partir du 14^{ème} jour de culture, on observe une hétérogénéité de la culture, avec 41% de proérythroblastes, 39% d'érythroblastes basophiles, 17% d'érythroblastes polychromatophiles et 3% d'érythroblastes acidophiles. Au 21^{ème} jour, la culture cellulaire ne présente plus de proérythroblastes, 11% d'érythroblastes basophiles, 27% d'érythroblastes polychromatophiles et 62% d'érythroblastes acidophiles.

Enfin la courbe de prolifération, en nombre cumulé de cellules, nous permet d'appréhender le taux de croissance cellulaire. Au cours de cette culture, nous avons donc obtenu un nombre cumulé de $6,05 \cdot 10^{10}$ cellules à partir d'une population initiale de $1 \cdot 10^6$ cellules (**Figure 34D**).

Comme le montre la **Figure 35**, entre le 1^{er} et le 6^{ème} jour de culture, les cellules prolifèrent lentement (temps de doublement d'environ 80h) alors que leur taille augmente fortement (facteur 1.4).

De façon intéressante, l'entrée des cellules en phase exponentielle de croissance (temps de doublement d'environ 18.5h), entre le 6^{ème} et le 16^{ème} jour, ne s'accompagne pas, dans un premier temps, de variations de taille. Cependant, lorsque les cellules sont placées dans un milieu de culture permettant leur différenciation, au 11^{ème} jour, leur taille commence à diminuer. A partir du 16^{ème} jour, lorsque la prolifération cellulaire ralentit (temps de doublement d'environ 42.5h), la taille des cellules continue à diminuer, jusqu'à atteindre une taille minimale, inférieure à leur taille initiale, mesurée 12h après isolement des progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺.

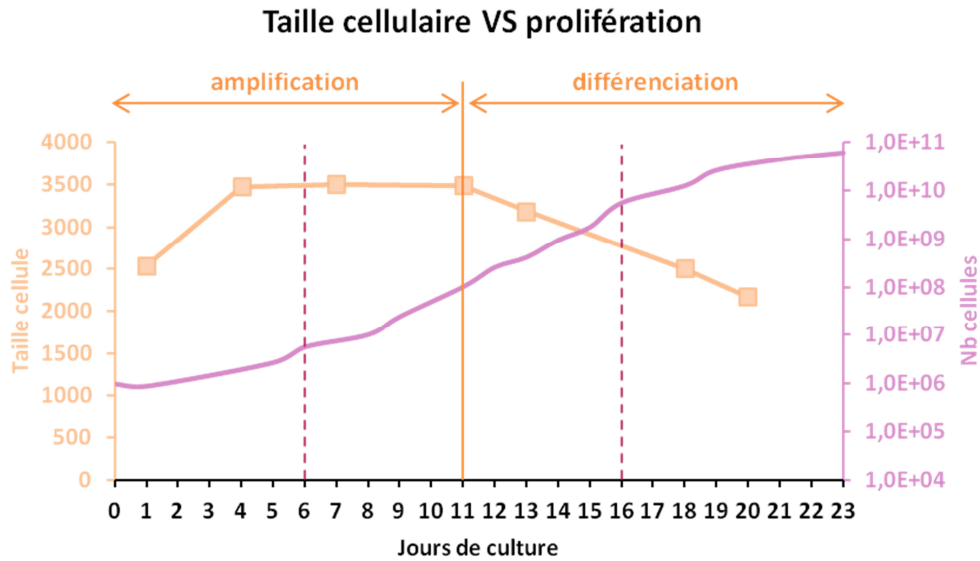


Figure 35 : Corrélation entre la taille des cellules et leur prolifération

Courbes de prolifération et suivi de l'évolution de la taille des cellules (médiane du Forward Scatter) au cours de la différenciation. Entre j0 et le 11^{ème} jour, les cellules sont en conditions d'amplification et entre le 11^{ème} et le 23^{ème} jour, elles sont en conditions de différenciation. Les pointillés délimitent les phases de latence et de prolifération exponentielle.

Nous avons ensuite réalisé des marquages immunofluorescents de la protéine nucléolaire NPM1, représentative du CG. La reconstitution 3D des cellules marquées, a permis d'analyser, de manière quantitative le volume et la surface des CG. Il est à noter que cette analyse a été réalisée sur les érythroblastes nucléés, marqués au DAPI.

Au fur et à mesure de la différenciation érythroïde, nous pouvons observer la condensation des noyaux. Il est à noter, qu'en début (entre le 8^{ème} et le 12^{ème} jour) et fin (entre le 19^{ème} et le 21^{ème} jour) de culture, les diamètres nucléaires sont assez homogènes, reflétant des populations cellulaires également homogènes. En milieu de culture (entre le 14^{ème} et le 16^{ème} jour), les noyaux ont des tailles variables, reflétant la coexistence de populations cellulaires hétérogènes (**Figure 36A**).

Au fur à et à mesure de la différenciation érythroïde, la taille des marquages immunofluorescents NPM1 diminue (**Figure 36A**).

Comme le montrent les graphiques de la **Figure 36B**, la différenciation érythroïde est associée à une réduction de la surface et du volume des CG. En effet, au 8^{ème} jour de culture, les CG arborent une surface et un volume moyen de $17,51 \mu\text{m}^2$ ($\text{SEM} \pm 1.073$) et $5.9\mu\text{m}^3$ ($\text{SEM} \pm 0.4765$) respectivement, alors qu'au 16^{ème} jour, la surface des CG est de $7.344 \mu\text{m}^2$ ($\text{SEM} \pm 0.4858$) et le volume est de $1.492 \mu\text{m}^3$ ($\text{SEM} \pm 0.1382$). Enfin, au 21^{ème} jour de culture, les CG ont une surface moyenne de $3.4\mu\text{m}^2$ ($\text{SEM} \pm 0.1498$) et un volume moyen de $0.5474 \mu\text{m}^3$ ($\text{SEM} \pm 0.03581$).

Les résultats obtenus semblent être cohérents avec les observations faites lors des études de la morphologie du nucléole menées sur des érythroblastes murins et d'embryons de poulet. En effet, ces deux travaux avaient rapporté qu'en fin de différenciation érythroïde, les nucléoles s'apparentaient à des « micronucléoles », et que le CG diminuait fortement de taille (Chelidze *et al.*, 1984) (Likovský *et al.*, 1994).

Cependant, il est possible que ces marquages immunofluorescents de la protéine NPM1 de petites tailles, correspondent à des NDF ou à des PNB. N'ayant pas réalisé d'analyse du cycle cellulaire ou de co-marquages d'autres protéines nucléolaires présentes dans ces structures, nous ne pouvons pas définir avec certitude la nature de ces foci.

De manière intéressante, il apparaît que ces deux paramètres décroissent parallèlement. Cette observation est validée par l'analyse de la sphéricité des CG qui n'est pas modifiée au cours de la différenciation érythroïde. En revanche, si nous donnons une valeur de 1 à une sphère idéale, nous observons que les CG ne sont jamais sphériques au cours de la différenciation érythroïde (**Figure 36B**).

De plus et quelque soit le stade de maturation des érythroblastes, nous n'observons pas de variations significatives du nombre de marquages immunofluorescents. En effet, au 8^{ème} jour de culture, les cellules arborent une moyenne de 3.03 ($\text{SEM} \pm 0.74$) marquages NPM1 par cellule, de 4.33 ($\text{SEM} \pm 0.23$) au 16^{ème} jour, de 3.86 ($\text{SEM} \pm 0.56$) au 19^{ème} jour et de 3.34 ($\text{SEM} \pm 0.64$) au 21^{ème} jour de culture (**Figure 36B**).

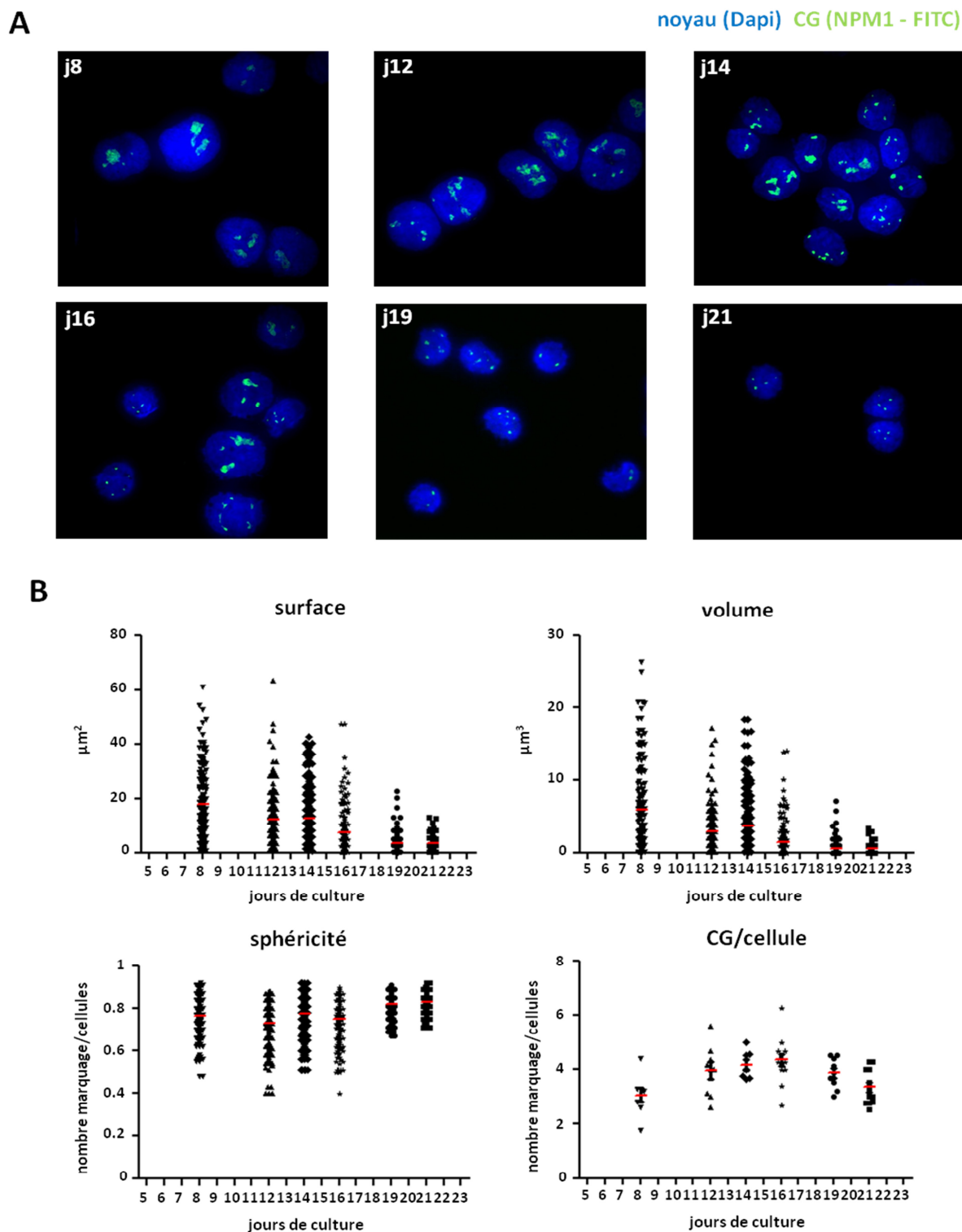


Figure 36 : Etude en immunofluorescence de la protéine nucléolaire NPM1

A. Marquages immunofluorescents de la protéine NPM1 dans les érythroblastes normaux à différents jours de culture. Ces images sont issues de la compression de toutes les images prises dans la profondeur de l'échantillon. **B.** Analyse quantitative grâce au logiciel de reconstitution 3D Imaris de chaque CG marqué.

Par la suite, nous avons réalisé une étude comparative de l'évolution du marquage immunofluorescent du CG en fonction de la taille des cellules et de leur prolifération. Comme le montre la **Figure 37A**, la diminution de la taille des cellules au cours de la différenciation érythroïde s'accompagne de la diminution du volume et de la surface des CG. En effet, entre le 8^{ème} et le 12^{ème} jour de différenciation érythroïde, la taille des cellules commence à réduire et les marquages des CG diminuent également en surface et en volume d'un facteur 1.4 et 2, respectivement. De plus, en fin de différenciation, entre le 19^{ème} et le 21^{ème} jour, lorsque le volume et la surface des CG ne varient plus (facteur 1.07 pour le volume et un facteur 1.06 pour la surface), nous constatons que les cellules ont atteint une taille minimale, inférieure à leur taille initiale, mesurée au lendemain de la purification des progéniteurs hématopoïétiques.

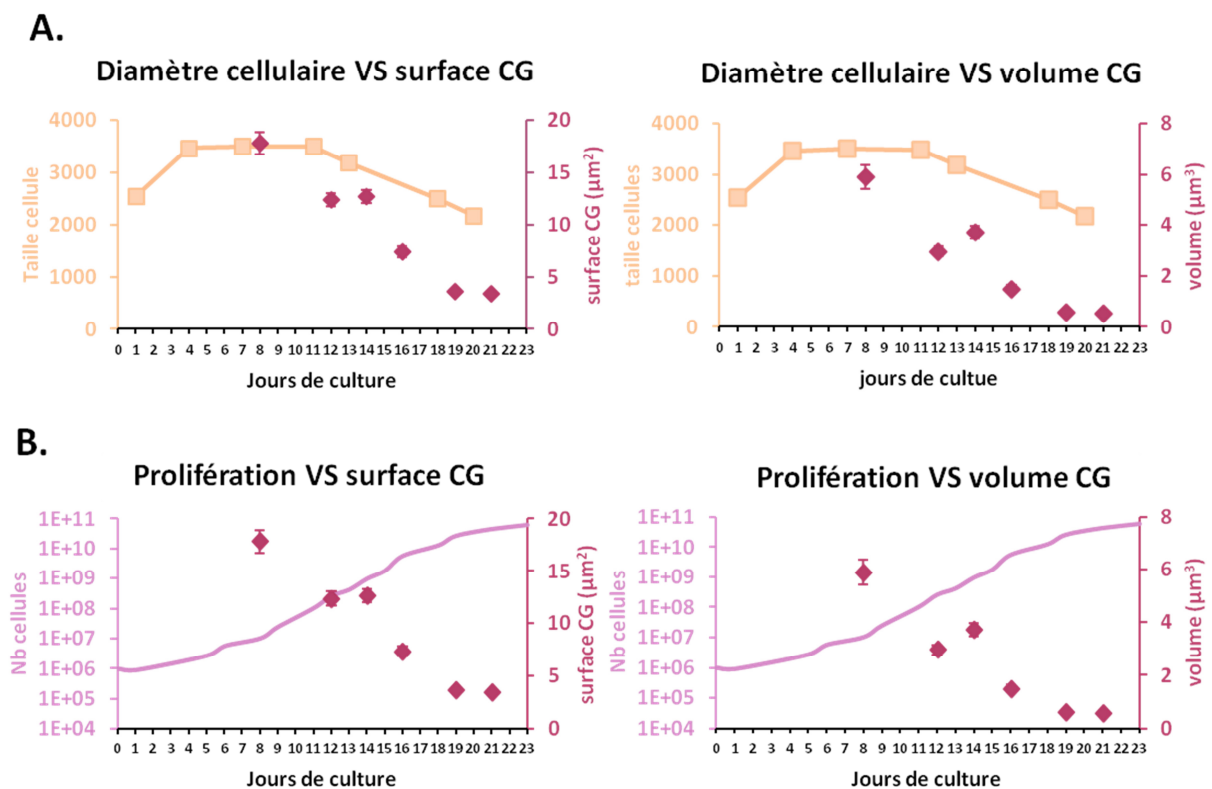


Figure 37 : Evolution de la taille des CG selon la taille et la prolifération des érythroblastes

A. Evolution de la taille des CG et des érythroblastes au cours de la différenciation érythroïde. **B.** Evolution de la taille des CG et de la prolifération des érythroblastes au cours de la différenciation érythroïde.

De plus, et comme montré précédemment, les étapes ultimes de la culture *ex vivo* d'érythroblastes s'accompagnent d'une réduction du pouvoir prolifératif des cellules. Il semble donc que cette réduction de prolifération, débutant au 16^{ème} jour de différenciation soit concomitante avec la stabilisation finale de la taille des CG (**Figure 37B**).

Ces résultats sont représentatifs des 6 échantillons normaux étudiés pour lesquels nous n'avons pas pu disposer d'autant de points de différenciation.

C. Morphologie nucléolaire au cours de la différenciation érythroïde pathologique des SMD

Comme montré précédemment, la différenciation érythroïde normale s'accompagne d'une réduction de taille des CG, tant au niveau de leur surface que de leur volume. Nous avons donc cherché à savoir si, dans un contexte pathologique de SMD de faible risque, l'évolution des CG est comparable.

Le **Tableau 3** représente la liste du matériel biologique utilisé.

Dans les cas pathologiques, nous avons étudié des cellules issues de patients porteurs de différents sous-types de SMD de faible risque, selon la classification OMS de 2008.

PATIENTS		TÉMOINS	
nom	OMS 2008	nom	types prélèvements
P1	SMD-U	N1	couche leuco-plaquettaire
P2	CRDM	N2	cordon
P3	5q-	N3	cônes de cytapphérèse
P4	AREB-1	N4	cônes de cytapphérèse
P5	CRDM	N5	cônes de cytapphérèse
P6	CRDM-RS	N6	cônes de cytapphérèse
P7	CRDM		
P8	CRDM		
P9	CRDM-RS		
P10	ASIA		
P11	CRDM		
P12	CRDM-RS		

Tableau 3: Matériel biologique humain utilisé

Nous avons étudié les CG des érythroblastes cultivés de douze patients porteurs d'un SMD de faible risque, de cinq donneurs sains et d'un sang de cordon. Les SMD sont classées en fonction de la classification OMS de 2008.

Sept groupes sont décrits dans la **Figure 38**.

Tous les groupes, à l'exception du groupe 7, contiennent des échantillons de patients et des échantillons de témoins comparables entre eux. L'absence d'échantillons de patients dans le groupe 7 est probablement le reflet du défaut de différenciation érythroïde terminale décrit dans les SMD.

Comme le montre la **Figure 39A et B**, chez les patients, au stade initial de différenciation érythroïde, lorsque les cellules sont immatures ou proérythroblastiques (correspondant au groupe 1), nous pouvons observer que les CG présentent une surface et un volume moyens de $16.6 \mu\text{m}^2$ ($\text{SEM} \pm 1.9$) et $4.2 \mu\text{m}^3$ ($\text{SEM} \pm 1.6$), alors que les CG de cellules contrôles présentent une surface et un volume moyen de $11.4 \mu\text{m}^2$ ($\text{SEM} \pm 0.5$) et $2.8 \mu\text{m}^3$ ($\text{SEM} \pm 0.6$) respectivement. La taille des CG tend donc à être plus importante chez

les patients par rapport aux témoins, même si la différence n'est pas statistiquement significative (surface $p=0.064$; volume, $p=0.1$) (Figure 39A et B).

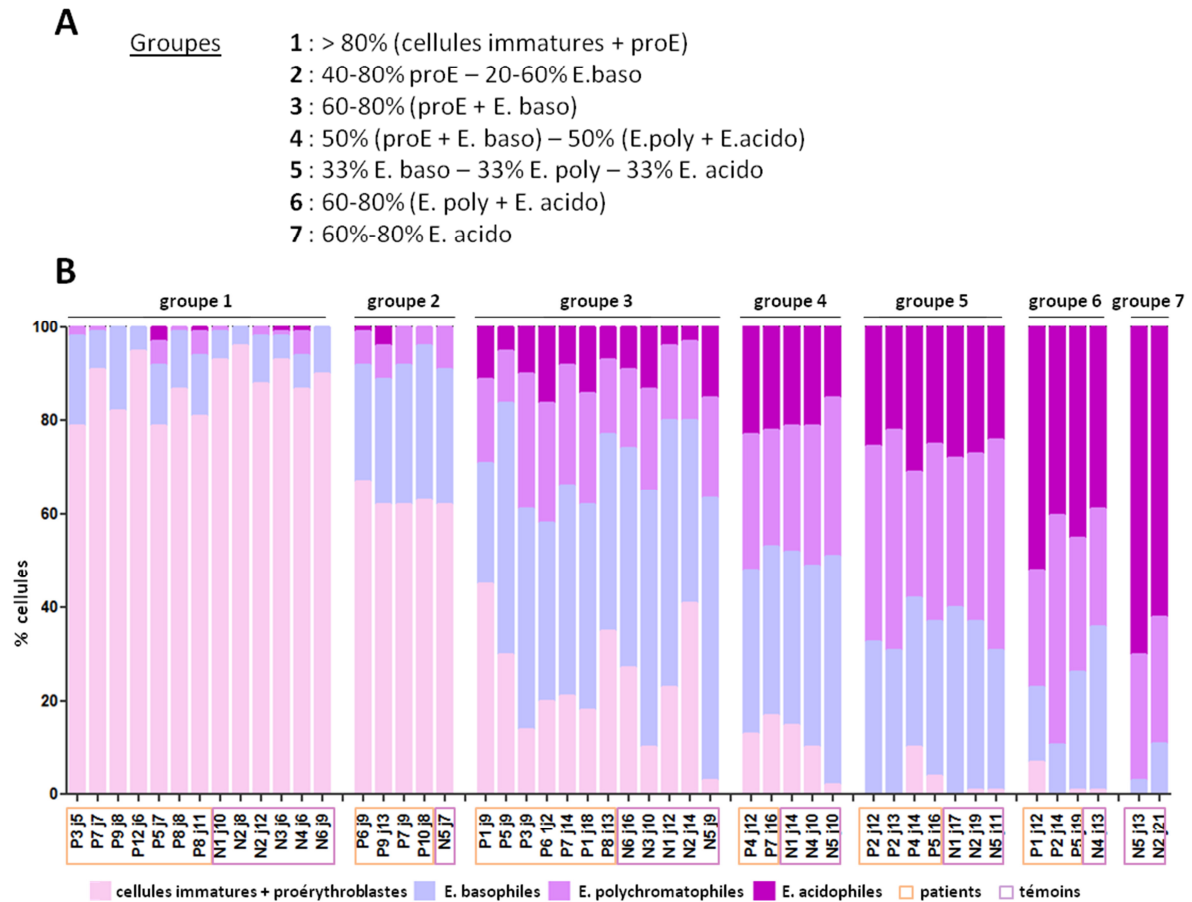


Figure 38 : Groupes d'échantillons en fonction de l'aspect cytologique de différenciation

A. Description des groupes de différenciation réalisés en fonction de la différenciation érythroïde évaluée sur la cytologie. **B.** Représentation des groupes d'échantillons de patients et de donneurs sains.

A un stade intermédiaire de différenciation, lorsque les échantillons ne présentent plus de cellules immatures, mais pas encore d'érythroblastes polychromatophiles et acidophiles (correspondant au groupe 3), les surfaces et les volumes des CG de cellules issues de patients porteurs d'un SMD de faible risque ou de cellules contrôles deviennent quasiment identiques. En effet, les CG des patients et des contrôles ont une surface moyenne de $10.2 \mu\text{m}^2$ (SEM ± 1.9) et $10.4 \mu\text{m}^2$ (SEM ± 2.1), respectivement, et un volume moyen de $2.4 \mu\text{m}^3$ (SEM ± 0.7) et $2.3 \mu\text{m}^3$ (SEM ± 0.6), respectivement. Par la suite, nous

pouvons observer que les marquages immunofluorescents de la protéine NPM1 diminuent de manière identique chez les patients et chez les sujets contrôles (**Figure 39A et B**).

Enfin, il apparaît que les cellules de patients et les cellules contrôles, présentent une moyenne comparable de marquages immunofluorescents par cellule, et que celle-ci ne varie pas au cours de la différenciation érythroïde (**Figure 39C**).

Néanmoins, il semble que les CG d'un même patient présentent des valeurs de surface et de volume plus hétérogènes que les CG d'un sujet contrôle. Cette observation pourrait être expliquée par le profil hétérogène de la pathologie. En effet, nous avons étudié différents sous-types de SMD de faible risque, dont certains présentent un excès de blastes.

De même, nous avons comparé la structure nucléolaire en microscopie électronique d'un échantillon d'érythroblastes issu d'un patient porteur d'un SMD de faible risque et d'un échantillon contrôle. Les résultats obtenus, et présentés dans **Figure 40**, montrent qu'à des stades de différenciation équivalents, la structure des nucléoles des cellules de patients est comparable à celle des cellules contrôles.

En effet, à un stade précoce de différenciation, lorsque les échantillons analysés sont composés de plus de 80% de cellules immatures ou de proérythroblastes (correspondant au groupe 1), les nucléoles des cellules pathologiques et les nucléoles des cellules contrôles présentent un CG granuleux, ainsi que des CF entourés de CFD. A des stades de maturation plus tardifs, lorsque les échantillons sont composés de 60% à 80% de proérythroblastes et d'érythroblastes basophiles (correspondant au groupe 3), les CG semblent être plus lisses et renferment moins de CF et de CFD (**Figure 40**).

Etant donné l'hétérogénéité des SMD, il convient de renouveler ces expériences sur un panel plus important de patients, et notamment d'étudier des anémies sidéroblastiques dont la cinétique de différenciation érythroïde en culture est plus rapide que celle des anémies réfractaires simples ou avec dysplasie multilignée.

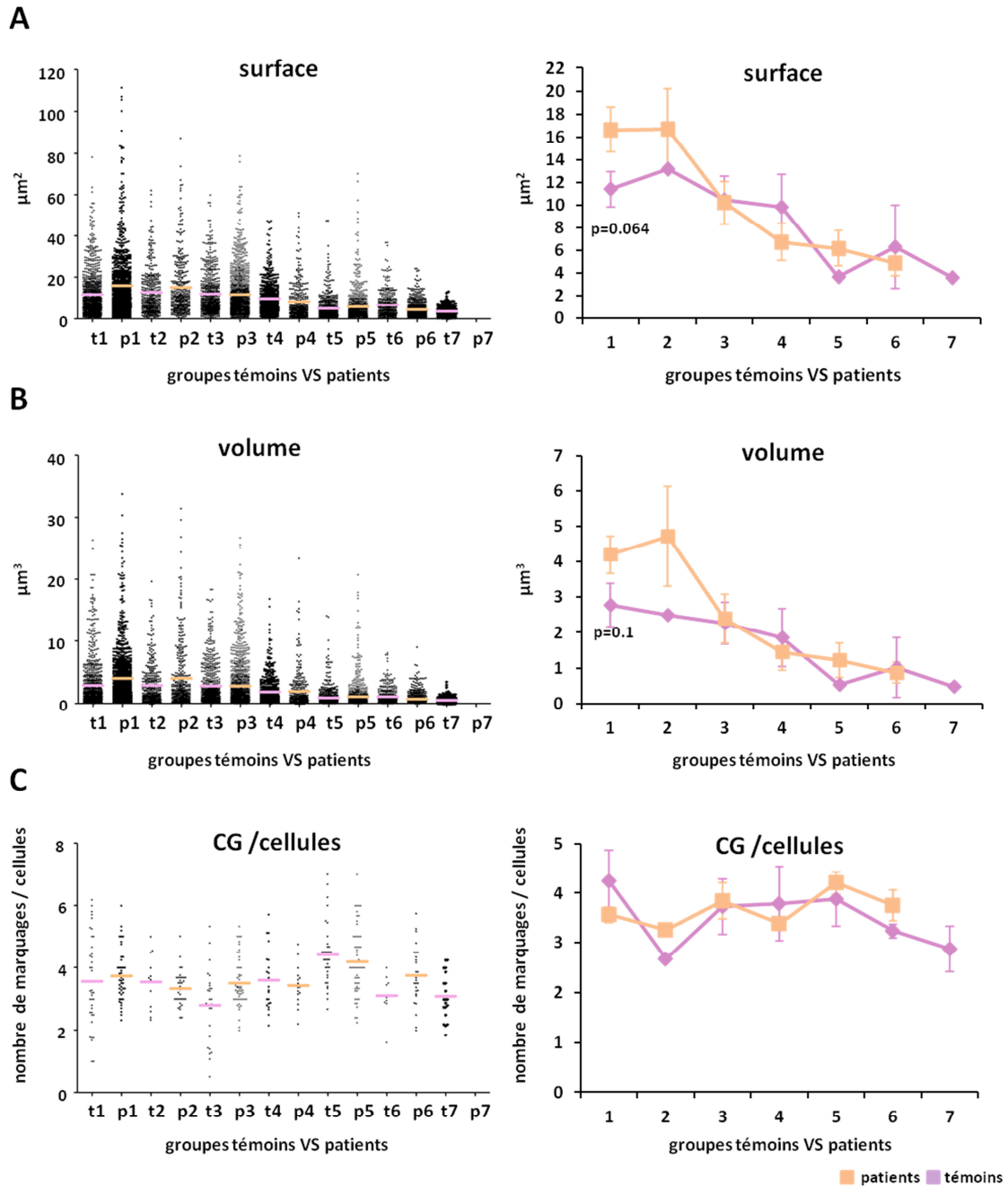


Figure 39 : Analyse comparative du composé granulaire au cours de la différenciation normale et pathologique

A. Evolution de la surface des CG en fonction de la différenciation érythroïde normale ou pathologique des SMD. **B.** Evolution du volume des CG en fonction de la différenciation érythroïde normale ou pathologique des SMD. **C.** Nombre de CG par cellule en fonction de la différenciation érythroïde normale ou pathologique des SMD. Sur les graphiques du panel de gauche, chaque point représente un marquage NPM1. Sur les graphiques du panel de droite sont représentées les valeurs moyennes et les SEM obtenues dans chaque groupe de différenciation.

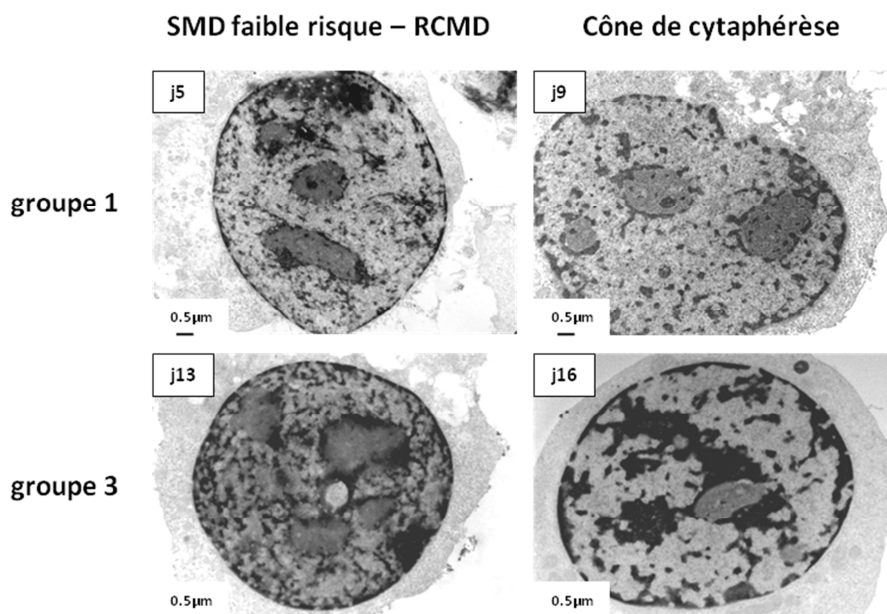


Figure 40 : Microscopie électronique de cellules issues de patients et de cellules contrôle

Microscopie électronique réalisée sur des cellules issues d'un patient porteur d'un SMD de faible risque de types RCMD et d'un donneur sain. Les deux échantillons sont à des stades de maturation identiques.

D. Persistance du composé granulaire au cours de la différenciation érythroïde

1. Microscopie photonique

L'analyse de l'évolution des CG au cours de la différenciation érythroïde a mis en évidence qu'en fin de maturation, le marquage NPM1 persiste, que ce soit sur des échantillons de cellules pathologiques ou de cellules témoins.

Afin de valider ces observations faites sur un nombre moyen de 60 cellules, nous avons dénombré ces marquages immunofluorescents sur une moyenne de 260 cellules.

Les résultats obtenus, et présentés dans la **Figure 41**, montrent bien la persistance des CG dans les cellules nucléées au fur et à mesure de la différenciation érythroïde. En effet, lorsque les échantillons analysés présentent plus de 80% de cellules immatures ou de

proérythroblastes (correspondant au groupe 1), 1.7% (SEM \pm 1.0) de cellules issues de patients porteurs d'un SMD et 2.2% (SEM \pm 1.3) de cellules contrôles ne présentent pas de marquages immunofluorescents. Lorsque les cellules s'engagent en différenciation, et que les échantillons analysés contiennent 30% d'érythroblastes basophiles, 30% d'érythroblastes polychromatophiles et 30% d'érythroblastes acidophiles (correspondant au groupe 5), le pourcentage de cellules contrôles non marquées est de 3%. Lorsque l'échantillon de cellules pathologiques contient 60% d'érythroblastes polychromatophiles et acidophiles (correspondant au groupe 6), le pourcentage de cellules non marquées est de 2%.

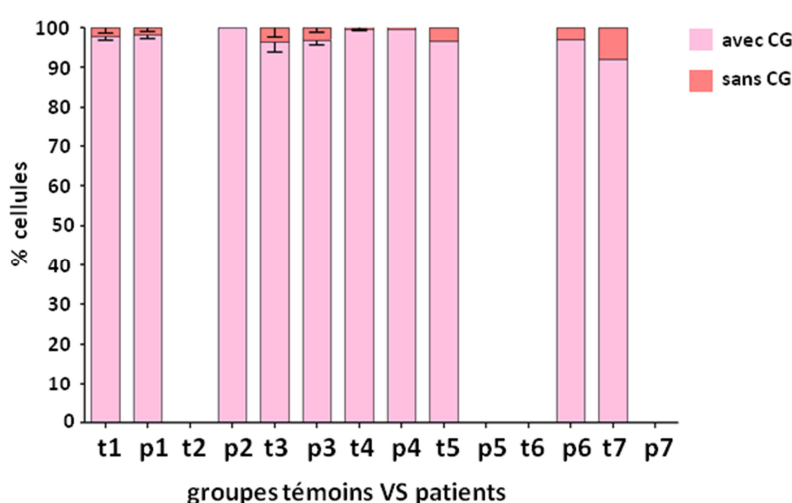


Figure 41 : Persistance du composé granulaire au cours de la différenciation normale et pathologiques des SMD de faible risque.

Analyse réalisée sur une moyenne de 260 cellules.

Il apparait donc que le pourcentage de cellules non marquées par rapport au pourcentage de cellules marquées est négligeable et invariable entre la condition pathologique et la condition contrôle au cours de la différenciation érythroïde.

Cependant, nous n'avons pas pu analyser d'échantillons de SMD du groupe 7, ce qui devra être fait pour confirmer la similitude entre patients et témoins à tous les stades de différenciation.

2. Microscopie électronique

Enfin, nous avons suivi, en microscopie électronique, l'évolution du nombre et de l'aspect des nucléoles d'érythroblastes normaux. Il est à noter que cette étude a été réalisée sur coupe unique. Il se peut donc que certains nucléoles ne soient pas sur le plan de coupe analysé, mais sur un plan inférieur ou supérieur. Néanmoins, pour chaque jour, nous avons observé une moyenne de 50 cellules.

Comme le montre la **Figure 42A**, et en accord avec les résultats obtenus en microscopie photonique, le nombre de nucléoles par cellule ne varie pas avec la différenciation érythroïde. Cependant, la structure fine des nucléoles évolue.

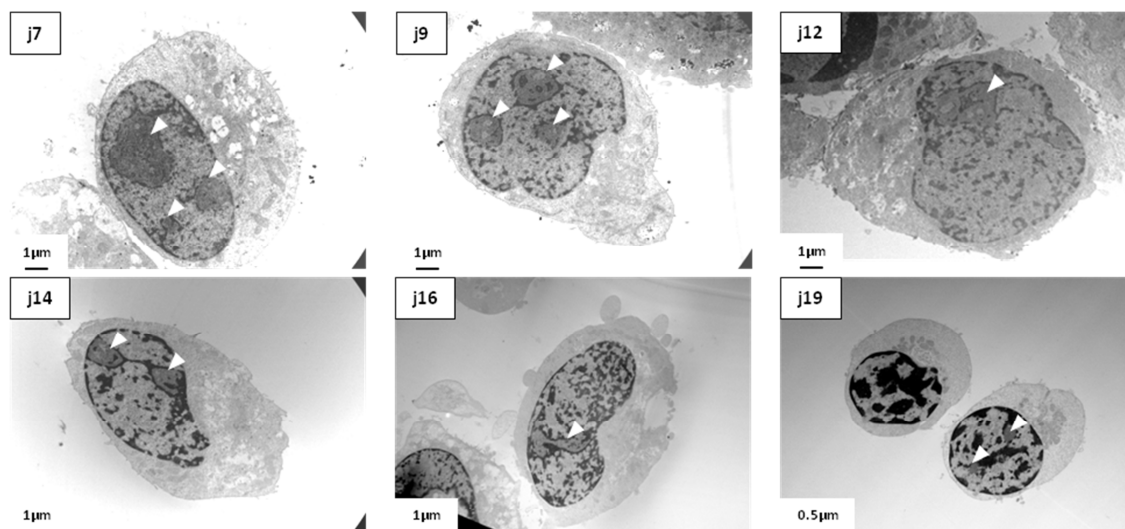
En effet, au début de la différenciation érythroïde, entre le 7^{ème} et le 12^{ème} jour de culture, lorsque l'échantillon est respectivement composé de 99% et 61% de cellules immatures ou proérythroblastiques, les nucléoles présentent des CG granuleux et peu homogènes, renfermant des CF entourés de CFD. A partir du 14^{ème} jour, lorsque les cellules s'engagent dans la différenciation, entre autre visible par la condensation de la chromatine, nous pouvons observer un aspect plus lisse des CG. Enfin, et de manière inattendue, lorsque les cellules atteignent des stades de maturation très tardifs (condensation de la chromatine et noyau en périphérie cellulaire), il apparait que les CG, toujours visibles, ne renferment plus de CF ni de CFD (**Figure 42B**).

Il semble donc qu'au fur et à mesure de la différenciation érythroïde, le nucléole subisse de nombreuses variations morphologiques, dont la persistance du composé granulaire et la disparition progressive des centres fibrillaires et des composants fibrillaires denses.

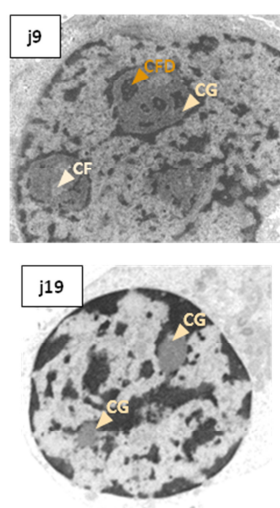
Cependant, le profil hétérogène de la culture *ex vivo* ne nous permet pas de déterminer à quel stade de différenciation érythroïde, les CF et les CFD disparaissent.

Nous n'avons pas encore pu réaliser la même analyse sur des érythroblastes de patients porteurs d'un SMD.

A



B



C

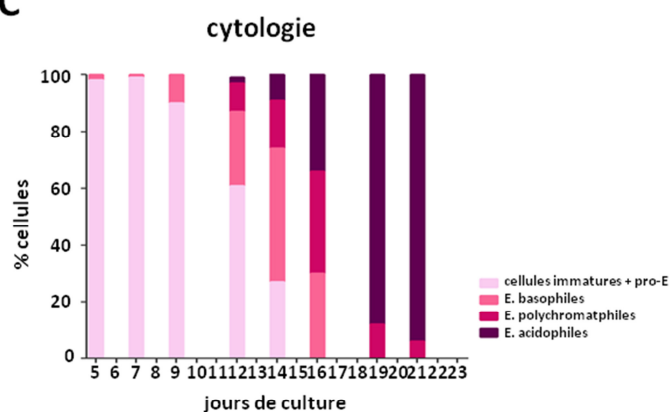


Figure 42 : Devenir du nucléole au cours de la différenciation érythroïde normale

A. Microscopie électronique réalisée sur une culture de cellules issues d'un cône de cytophérèse. **B.** Agrandissement du noyau d'un proérythroblaste (9^{ème} jour) et d'un érythroblaste polychromatophile au 19^{ème} jour de culture ; CF : Centre Fibrillaire, CFD : Composant Fibrillaires Dense, CG : Composé Granulaire. **C.** Décompte cytologique des cellules en cours de différenciation.

V. Perspectives

Au cours de ce travail, nous avons analysé, de manière qualitative en microscopie électronique, et quantitative, par des marquages immunofluorescents de la protéine NPM1, représentative du composé granulaire (CG), la morphologie du nucléole au cours de la différenciation érythroïde normale et pathologique des syndromes myélodysplasiques de faible risque. Le nucléole étant un domaine spécifique du noyau qui abrite la biogenèse des ribosomes.

Dans un premier temps, nous avons observé que la diminution de la taille des cellules au cours de la différenciation érythroïde s'accompagne d'une réduction de la taille des CG. Ces résultats sont en accord avec l'étude morphologique des nucléoles réalisée en microscopie électronique sur des érythroblastes murins en cours de différenciation, menée en 1983 par Sasaki (Sasaki *et al.*, 1983). Nous avons également montré qu'en fin de différenciation, dans les érythroblastes acidophiles, les CG atteignent leur taille minimale.

Notre étude morphologique des nucléoles en microscopie électronique, a permis de mettre en évidence que l'entrée des cellules en phase terminale de différenciation s'accompagne de la disparition des centres fibrillaires (CF) ainsi que des composants fibrillaires dense (CFD) (compartiments structuraux du nucléole), alors que le CG, lieu de maturation terminale des ARNr déjà synthétisés (Puvion-Dutilleul *et al.*, 1991) (Shaw *et al.*, 1995), persiste. La cinétique de disparition des CF et des CFD reste néanmoins à déterminer par des marquages immunofluorescents de protéines représentatives, telles que le facteur de transcription UBF ou la fibrillarine, respectivement.

Bien que le lieu de synthèse des ARN ribosomiques (CF ou CFD ou interface CF/CFD) reste encore un sujet de débat (Koberna *et al.*, 2002) (Derenzini *et al.*, 2006) (Raska *et al.*, 2006) (Shaw *et al.*, 1995), il a été suggéré que les cellules HeLa en phase exponentielle de croissance, nécessitant donc une forte synthèse protéique, ont des nucléoles volumineux renfermant plusieurs CF de petites tailles et qu'à contrario, lorsque les cellules réduisent leur métabolisme, les CF s'élargissent (Koberna *et al.*, 2002). La disparition du CF et du CFD

suggère donc un arrêt de la transcription des ARNr, et par conséquent une inactivation fonctionnelle du nucléole.

L'aspect des nucléoles d'érythroblastes matures est très différent de celui obtenu après l'inhibition de la transcription des ARNr et donc de la biogenèse des ribosomes par une faible dose d'actinomycine D, qui provoque une ségrégation des trois composants du nucléole (Shav-Tal *et al.*, 2005). A ce stade, il est difficile de dire si cette ségrégation, qui est le reflet d'un stress nucléolaire majeur, est due à l'inhibition de biogenèse des ribosomes et/ou à l'inhibition de la synthèse des ARNm par l'actinomycine D. L'utilisation, dans les érythroblastes primaires, d'un composé plus spécifique de l'ARN polymérase I, tel que le CX5461 (Drygin *et al.*, 2011) (Bywater *et al.*, 2012) permettra d'étudier les changements de morphologie du nucléole en réponse à la seule inhibition de la transcription des ARNr.

Si les premières images que nous avons obtenues en microscopie électronique sur les érythroblastes primaires normaux et pathologiques ne sont pas évocatrices d'un stress nucléolaire, ceci ne permet pas d'exclure une altération de biogenèse des ribosomes. Il a été montré que l'haploinsuffisance d'un gène ribosomique, ou l'induction d'un stress ribosomique par une stratégie shARN n'a pas obligatoirement des conséquences majeures sur la morphologie des nucléoles. En effet, l'étude en microscopie photonique de cellules n'exprimant pas certaines protéines de la petite sous-unité 40S du ribosome, telles que Rps19, Rps6 ou Rps14 n'a montré aucune ségrégation des compartiments nucléolaires (Choesmel *et al.*, 2007) (Fumagalli *et al.*, 2009) (Dutt *et al.*, 2011).

La taille des CG mesurée par le marquage en immunofluorescence de la protéine NPM1 pourrait refléter la biogenèse des ribosomes. Dans le laboratoire, celle-ci est en cours d'étude par des techniques de purification des ribosomes sur gradient de sucrose suivies d'une analyse chromatographique des sous-unités 40S, 60S, 80S et des polysomes. Les premiers résultats obtenus dans l'érythropoïèse normale montrent qu'une diminution de la biogenèse des ribosomes, qui pourrait être contemporaine de la diminution de volume et de la surface des CG que nous rapportons ici, précède la réduction de taille des érythroblastes. Pour confirmer cette hypothèse, les analyses de biogenèse des ribosomes et de morphologie du nucléole doivent être menées en parallèle sur un plus grand nombre d'échantillons.

Nous faisons donc l'hypothèse que l'entrée des cellules en phase terminale de différenciation dépend d'une réduction de la biogenèse des ribosomes entraînant une réduction de la synthèse protéique.

Des résultats de l'équipe de M. von Lindern suggèrent que l'arrêt de la synthèse protéique est nécessaire à la différenciation érythroïde terminale. En effet, la surexpression du facteur d'initiation de la traduction eIF4E, qui augmente le recrutement d'ARNm codant des protéines ribosomiques et des facteurs d'initiation et d'élongation de la traduction sur les polysomes, bloque la différenciation des érythroblastes (Blázquez-Domingo *et al.*, 2005). De plus, il est établi que la différenciation érythroïde terminale se déroule en trois ou quatre divisions cellulaires sans conservation de la taille initiale des cellules (Dolznig *et al.*, 2001) (Topisirovic *et al.*, 2003).

Ceci suggère donc que le niveau de synthèse protéique est le point de contrôle de l'entrée en phase terminale de différenciation.

Dans les cellules en auto-renouvellement, la balance fine entre synthèse protéique et progression en phase G1 du cycle cellulaire permet le maintien de la taille des cellules à chaque division (Zetterberg *et al.*, 1995) (Dolznig *et al.*, 2004). En revanche, dans des cellules en différenciation, telles que les érythroblastes matures, la diminution de synthèse protéique n'arrête pas la progression en phase G1, ce qui signifie que la synthèse protéique n'est plus un facteur limitant pour la différenciation.

Il conviendra alors de déterminer si ce point de contrôle est la traduction de certains ARNm, comme le suggèrent les travaux de M. von Lindern, ou la biogenèse des ribosomes elle-même comme le proposent les travaux de F. Morlé. Cette équipe a, en effet, montré que l'inactivation des facteurs de transcription ETS Fli-1 et Spi-1, qui bloque la prolifération et induit la différenciation des cellules érythroïdes de la lignée d'érythroleucémie murine de Friend, s'accompagne d'une diminution d'expression de nombreux transcrits parmi lesquels 20% codent pour des protéines impliquées dans la biogenèse des ribosomes (Juban *et al.*, 2009). Ceci suggère donc que l'arrêt de biogenèse est concomitant avec l'entrée en différenciation.

Notre équipe étudie actuellement les moyens de moduler la biogenèse des ribosomes sans induire la mort cellulaire par apoptose, *via* une stratégie de ciblage shARN de

protéines ribosomiques dans les érythroblastes normaux, grâce à des constructions lentivirales inducibles.

Pour déterminer avec précision à quel stade de différenciation la morphologie nucléolaire se modifie, nous nous proposons de séparer les sous-populations érythroïdes obtenues en culture non pas sur les marqueurs CD71 et GPA, peu précis, mais sur les marqueurs CD49d (intégrine $\alpha 4$ ou VLA-4) et Band-3, récemment publiés (Hu *et al.*, 2013). Les marquages immunofluorescents de NPM1, d'UBF et de la fibrillarine, ainsi qu'une étude en microscopie électronique, demandant peu de matériel biologique, seront alors réalisés sur des populations cellulaires plus homogènes.

Sur ces quantités limitées de cellules, la biogenèse des ribosomes pourra être étudiée grâce à une quantification de l'ADNr et des pré-ARNr en cours de maturation, par des techniques de PCR (Polymerase Chain Reaction) quantitatives spécifiques.

Dans une seconde partie de cette étude, nous avons analysé la morphologie nucléolaire, ainsi que la taille des CG, dans le contexte pathologique de syndromes myélodysplasiques de faible risque. Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence qu'aux stades précoces de la différenciation érythroïde, lorsque les échantillons sont majoritairement composés de cellules immatures ou de proérythroblastes, les CG des cellules pathologiques affichent un volume et une surface supérieurs à ceux des CG contrôles. Cependant, lorsque les échantillons ne présentent plus de cellules immatures, et que les érythroblastes s'engagent dans les stades terminaux de la différenciation, les CG pathologiques et les CG contrôles ont des valeurs de surface et de volume comparables. Notre étude en microscopie électronique n'a révélé aucune variation morphologique du nucléole entre les patients et les sujets contrôles.

Ces observations n'excluent pas la possibilité que les SMD soient une ribosomopathie. En effet, les anomalies morphologiques des nucléoles rapportées au cours de l'anémie de Blackfan-Diamond sont plutôt minimes. Il a été montré que les nucléoles de patients porteurs de mutations dans le gène *Rps19* présentaient des CFD plus denses aux électrons que les nucléoles de patients également porteurs de cette anémie, mais ne présentant aucune mutation dans des gènes codant une protéine ribosomique (Choesmel *et al.*, 2007). De plus, une étude menée sur l'impact de la délétion des protéines ribosomiques

de la petite sous-unité 40S du ribosome a montré que la morphologie nucléolaire n'est généralement pas altérée, et que seule la déplétion de la protéine Rps16 initie un regroupement des CFD en périphérie du nucléole, rappelant les effets de l'actinomycine D (O'Donohue *et al.*, 2010).

Enfin, une altération de l'expression de gènes codant des protéines ribosomiques de la petite ou de la grande sous-unité du ribosome a été rapportée chez des patients porteurs de SMD de faible risque non 5q- (McGowan *et al.*, 2011). Comme évoqué précédemment, des études préliminaires menées au laboratoire sur les érythroblastes cultivés de patients atteints de SMD de faible risque ont mis en évidence des variations d'expression de certaines protéines ribosomiques, par rapport à des sujets contrôles.

Pour explorer cette hypothèse, une analyse de profils de ribosomes des érythroblastes pathologiques est menée au laboratoire. Lorsque les échantillons ne contiennent pas de cellules immatures, mais sont composés d'une population hétérogène de précurseurs érythroïdes, les cellules pathologiques présentent une quantité de ribosomes matures et de polysomes en cours de traduction inférieure aux cellules contrôles. Ceci suggère donc un ralentissement prématuré de biogenèse des ribosomes dans les érythroblastes pathologiques, qui pourrait induire une diminution de synthèse protéique et une apoptose accrue par stabilisation de p53. Cette hypothèse est en cours d'étude.

A ce stade, il est difficile de dire s'il s'agit d'une cause ou d'une conséquence de la maladie.

Discussion générale

L'axe de signalisation SCF/c-Kit est indispensable à la différenciation, à la survie et à la prolifération des cellules érythroïdes. Cependant, l'entrée des cellules dans les phases terminales de différenciation nécessite la disparition du récepteur c-Kit, et nous avons pu mettre en évidence que son internalisation forcée, en réponse à un inhibiteur de tyrosine kinase, l'imatinib, induit l'accélération de la différenciation érythroïde terminale normale.

Au cours de l'analyse phospho-protéomique réalisée sur les cellules érythroleucémiques dépendantes de l'érythropoïétine mais exprimant de manière ectopique le récepteur c-Kit (UT-7/EPO), nous avons pu montrer une phosphorylation des tyrosines 703 et 936 présentes sur le domaine juxtamembranaire de c-Kit, en l'absence de SCF. Ces tyrosines sont le point d'ancrage des protéines Grb2 et APS, impliquées dans l'internalisation et la dégradation de c-Kit *via* l'ubiquitine E3-ligase c-Cbl, en réponse au SCF (Wollberg *et al.*, 2003) (Sun *et al.*, 2007). Si nous parvenons à démontrer que la phosphorylation de ces tyrosines est dépendante de l'EPO, ceci permettra d'évoquer le rôle de l'EPO dans l'induction de l'internalisation de c-Kit en l'absence de son ligand et de démontrer un mécanisme de conversation entre les récepteurs de l'EPO et c-Kit, hypothèse émise depuis plusieurs années.

Dans un contexte pathologique de syndromes myélodysplasique de faible risque, il a été suggéré que c-Kit est surexprimé à la surface des progéniteurs érythroïdes. De plus, des études préliminaires réalisées au laboratoire évoquent la persistance de c-Kit à la membrane des érythroblastes matures. Enfin, et bien que l'expression du R-EPO à la surface des érythroblastes pathologiques en cours de différenciation ne diffère pas chez les patients et chez les sujets contrôles, il a été suggéré que la signalisation en aval du R-EPO chez des patients porteurs d'un SMD de faible risque et résistants à l'EPO puisse être altérée.

En accord avec ces données et l'hypothèse d'un rôle de l'EPO dans l'internalisation de c-Kit, nous proposons que la persistance de c-Kit à la membrane des érythroblastes pathologiques en cours de différenciation résulte d'une coopération avortée entre c-Kit et R-EPO.

De plus, il a été montré que l'ajout de SCF aux cultures de progéniteurs érythroïdes en milieu semi-solide contenant de l'EPO permettait d'améliorer la croissance défailante de

colonies de type BFU-E dans les SMD de faible risque. Au stade de progéniteurs immatures la coopération entre c-Kit et R-EPO semble donc bénéfique.

A l'état normal, l'expression de c-Kit disparaît de la surface des érythroblastes basophiles, au moment où sont observées une activation des caspases et une réduction de synthèse protéique et de la biogenèse des ribosomes. En revanche, la persistance inappropriée de c-Kit observée chez 30% des patients empêcherait l'entrée en différenciation terminale.

Nous proposons donc de caractériser les cas de SMD avec expression ectopique de c-Kit sur les érythroblastes immatures en termes cliniques (sous-type WHO, réponse à l'EPO) et biologiques (prolifération et apoptose des précurseurs). Sur le plan mécanistique, il serait intéressant de déterminer l'impact de l'expression ectopique de c-Kit sur les différentes étapes de la biogenèse des ribosomes.

Par ailleurs, des résultats préliminaires du laboratoire suggèrent qu'un arrêt prématuré de biogenèse des ribosomes peut être observé dans les érythroblastes de SMD non 5q- bien que la morphologie du nucléole ne soit pas altérée. Ceci pourrait contribuer à l'activation de p53. Sachant que l'inhibition de la signalisation induite par le récepteur de mort Fas n'abolit pas complètement l'apoptose des érythroblastes en culture (Claessens *et al.*, 2002) (Claessens *et al.*, 2005), nous faisons l'hypothèse d'une implication de p53 dans le phénotype apoptotique des érythroblastes de SMD. L'invalidation de p53 dans des cellules pathologiques, à l'aide d'une stratégie d'ARN interférence pourrait également nous aider à la compréhension de ce phénotype.

Il conviendra de quantifier l'expression de c-Kit dans ces cas pathologiques afin de comprendre si l'expression ectopique de c-Kit et l'arrêt prématuré de biogenèse des ribosomes sont des événements mutuellement exclusifs.

Nos travaux devraient donc contribuer à mieux comprendre l'hétérogénéité phénotypique des SMD.

Bibliographie

-A-

Agosti, V., Karur, V., Sathyanarayana, P., Besmer, P., and Wojchowski, D.M. (2009). A KIT juxtamembrane PY567 -directed pathway provides nonredundant signals for erythroid progenitor cell development and stress erythropoiesis. *Exp. Hematol.* 37, 159–171.

Alers, S., Löffler, A.S., Wesselborg, S., and Stork, B. (2012). Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Mol. Cell. Biol.* 32, 2–11.

Andersen, J.S., Lyon, C.E., Fox, A.H., Leung, A.K.L., Lam, Y.W., Steen, H., Mann, M., and Lamond, A.I. (2002). Directed proteomic analysis of the human nucleolus. *Curr. Biol.* 12, 1–11.

Andersen, J.S., Lam, Y.W., Leung, A.K.L., Ong, S.-E., Lyon, C.E., Lamond, A.I., and Mann, M. (2005). Nucleolar proteome dynamics. *Nature* 433, 77–83.

Anderson, D.M., Williams, D.E., Tushinski, R., Gimpel, S., Eisenman, J., Cannizzaro, L.A., Aronson, M., Croce, C.M., Huebner, K., and Cosman, D. (1991). Alternate splicing of mRNAs encoding human mast cell growth factor and localization of the gene to chromosome 12q22-q24. *Cell Growth Differ.* 2, 373–378.

Angelier, N., Tramier, M., Louvet, E., Coppey-Moisand, M., Savino, T.M., De Mey, J.R., and Hernandez-Verdun, D. (2005). Tracking the interactions of rRNA processing proteins during nucleolar assembly in living cells. *Mol. Biol. Cell* 16, 2862–2871.

Ashman, L.K., Cambareri, A.C., To, L.B., Levinsky, R.J., and Juttner, C.A. (1991). Expression of the YB5.B8 antigen (c-kit proto-oncogene product) in normal human bone marrow. *Blood* 78, 30–37.

Austin, K.M., Leary, R.J., and Shimamura, A. (2005). The Shwachman-Diamond SBDS protein localizes to the nucleolus. *Blood* 106, 1253–1258.

-B-

Backx, B., Broeders, L., Hoefsloot, L.H., Wognum, B., and Löwenberg, B. (1996). Erythropoiesis in myelodysplastic syndrome: expression of receptors for erythropoietin and kit ligand. *Leukemia* 10, 466–472.

Bandi, S.R., Brandts, C., Rensinghoff, M., Grundler, R., Tickenbrock, L., Köhler, G., Duyster, J., Berdel, W.E., Müller-Tidow, C., Serve, H., et al. (2009). E3 ligase-defective Cbl mutants lead to a generalized mastocytosis and myeloproliferative disease. *Blood* 114, 4197–4208.

Baumgartner, C., Cerny-Reiterer, S., Sonneck, K., Mayerhofer, M., Gleixner, K.V., Fritz, R., Kerenyi, M., Boudot, C., Gouilleux, F., Kornfeld, J.-W., et al. (2009). Expression of activated STAT5 in neoplastic mast cells in systemic mastocytosis: subcellular distribution and role of the transforming oncoprotein KIT D816V. *Am. J. Pathol.* 175, 2416–2429.

Bazan, J.F. (1989). A novel family of growth factor receptors: a common binding domain in the growth hormone, prolactin, erythropoietin and IL-6 receptors, and the p75 IL-2 receptor beta-chain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164, 788–795.

Besmer, P., Murphy, J.E., George, P.C., Qiu, F., Bergold, P.J., Lederman, L., Snyder, H.W., Brodeur, D., Zuckerman, E.E., and Hardy, W.D. (1986). A new acute transforming feline retrovirus and relationship of its oncogene v-kit with the protein kinase gene family. *Nature* 320, 415–421.

Blázquez-Domingo, M., Grech, G., and Von Lindern, M. (2005). Translation initiation factor 4E inhibits differentiation of erythroid progenitors. *Mol. Cell. Biol.* 25, 8496–8506.

Blechman, J.M., Lev, S., Barg, J., Eisenstein, M., Vaks, B., Vogel, Z., Givol, D., and Yarden, Y. (1995). The fourth immunoglobulin domain of the stem cell factor receptor couples ligand binding to signal transduction. *Cell* 80, 103–113.

Blume-Jensen, P., Rönnstrand, L., Gout, I., Waterfield, M.D., and Heldin, C.H. (1994). Modulation of Kit/stem cell factor receptor-induced signaling by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 269, 21793–21802.

Blume-Jensen, P., Wernstedt, C., Heldin, C.H., and Rönnstrand, L. (1995). Identification of the major phosphorylation sites for protein kinase C in kit/stem cell factor receptor in vitro and in intact cells. *J. Biol. Chem.* 270, 14192–14200.

Boissel, N., Leroy, H., Brethon, B., Philippe, N., De Botton, S., Auvrignon, A., Raffoux, E., Leblanc, T., Thomas, X., Hermine, O., et al. (2006). Incidence and prognostic impact of c-Kit, FLT3, and Ras gene mutations in core binding factor acute myeloid leukemia (CBF-AML). *Leukemia* 20, 965–970.

Boocock, G.R.B., Morrison, J.A., Popovic, M., Richards, N., Ellis, L., Durie, P.R., and Rommens, J.M. (2003). Mutations in SBDS are associated with Shwachman-Diamond syndrome. *Nat. Genet.* 33, 97–101.

Boria, I., Quarello, P., Avondo, F., Garelli, E., Aspesi, A., Carando, A., Campagnoli, M.F., Dianzani, I., and Ramenghi, U. (2008). A new database for ribosomal protein genes which are mutated in Diamond-Blackfan Anemia. *Hum. Mutat.* 29, E263–270.

Boultonwood, J., Fidler, C., Strickson, A.J., Watkins, F., Gama, S., Kearney, L., Tosi, S., Kasprzyk, A., Cheng, J.-F., Jaju, R.J., et al. (2002). Narrowing and genomic annotation of the commonly deleted region of the 5q- syndrome. *Blood* 99, 4638–4641.

Brannan, C.I., Lyman, S.D., Williams, D.E., Eisenman, J., Anderson, D.M., Cosman, D., Bedell, M.A., Jenkins, N.A., and Copeland, N.G. (1991). Steel-Dickie mutation encodes a c-kit ligand lacking transmembrane and cytoplasmic domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 4671–4674.

Brizzi, M.F., Zini, M.G., Aronica, M.G., Blechman, J.M., Yarden, Y., and Pegoraro, L. (1994). Convergence of signaling by interleukin-3, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and mast cell growth factor on JAK2 tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 269, 31680–31684.

Brizzi, M.F., Dentelli, P., Rosso, A., Yarden, Y., and Pegoraro, L. (1999). STAT protein recruitment and activation in c-Kit deletion mutants. *J. Biol. Chem.* 274, 16965–16972.

Broudy, V.C., Lin, N., Brice, M., Nakamoto, B., and Papayannopoulou, T. (1991). Erythropoietin receptor characteristics on primary human erythroid cells. *Blood* 77, 2583–2590.

Broudy, V.C., Lin, N.L., Bühring, H.J., Komatsu, N., and Kavanagh, T.J. (1998). Analysis of c-kit receptor dimerization by fluorescence resonance energy transfer. *Blood* 91, 898–906.

Broudy, V.C., Lin, N.L., Liles, W.C., Corey, S.J., O’Laughlin, B., Mou, S., and Linnekin, D. (1999). Signaling via Src family kinases is required for normal internalization of the receptor c-Kit. *Blood* 94, 1979–1986.

Broudy, V.C., Lin, N.L., and Sabath, D.F. (2001). The fifth immunoglobulin-like domain of the Kit receptor is required for proteolytic cleavage from the cell surface. *Cytokine* 15, 188–195.

Buchdunger, E., Cioffi, C.L., Law, N., Stover, D., Ohno-Jones, S., Druker, B.J., and Lydon, N.B. (2000). Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 295, 139–145.

Bywater, M.J., Poortinga, G., Sanij, E., Hein, N., Peck, A., Cullinane, C., Wall, M., Cluse, L., Drygin, D., Anderes, K., et al. (2012). Inhibition of RNA polymerase I as a therapeutic strategy to promote cancer-specific activation of p53. *Cancer Cell* 22, 51–65.

-C-

Campagnoli, M.F., Ramenghi, U., Armiraglio, M., Quarello, P., Garelli, E., Carando, A., Avondo, F., Pavesi, E., Fribourg, S., Gleizes, P.-E., et al. (2008). RPS19 mutations in patients with Diamond-Blackfan anemia. *Hum. Mutat.* 29, 911–920.

Carron, C., Balor, S., Delavoie, F., Plisson-Chastang, C., Faubladiet, M., Gleizes, P.-E., and O’Donohue, M.-F. (2012). Post-mitotic dynamics of pre-nucleolar bodies is driven by pre-rRNA processing. *J. Cell. Sci.* 125, 4532–4542.

Chabot, B., Stephenson, D.A., Chapman, V.M., Besmer, P., and Bernstein, A. (1988). The proto-oncogene c-kit encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse W locus. *Nature* 335, 88–89.

Chaix, A., Arcangeli, M.-L., Lopez, S., Voisset, E., Yang, Y., Vita, M., Letard, S., Audebert, S., Finetti, P., Birnbaum, D., et al. (2013). KIT-D816V oncogenic activity is controlled by the juxtamembrane docking site Y568-Y570. *Oncogene*.

Chan, P.M., Ilangumaran, S., La Rose, J., Chakrabartty, A., and Rottapel, R. (2003). Autoinhibition of the kit receptor tyrosine kinase by the cytosolic juxtamembrane region. *Mol. Cell. Biol.* 23, 3067–3078.

- Chasis, J.A., and Mohandas, N. (2008). Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis. *Blood* 112, 470–478.
- Chelidze, P.V., Larioni, L.K., Agladze, A.G., and Dzhindzholiia, S.R. (1984). [Ultrastructure and behavior of the nucleoli and fibrillar centers during cell differentiation of liver erythroblasts of 12-day-old mouse embryos]. *Tsitologiya* 26, 878–885.
- Chen, D., Zhang, Z., Li, M., Wang, W., Li, Y., Rayburn, E.R., Hill, D.L., Wang, H., and Zhang, R. (2007). Ribosomal protein S7 as a novel modulator of p53-MDM2 interaction: binding to MDM2, stabilization of p53 protein, and activation of p53 function. *Oncogene* 26, 5029–5037.
- Chian, R., Young, S., Danilkovitch-Miagkova, A., Rönstrand, L., Leonard, E., Ferrao, P., Ashman, L., and Linnekin, D. (2001). Phosphatidylinositol 3 kinase contributes to the transformation of hematopoietic cells by the D816V c-Kit mutant. *Blood* 98, 1365–1373.
- Chin, H., Nakamura, N., Kamiyama, R., Miyasaka, N., Ihle, J.N., and Miura, O. (1996). Physical and functional interactions between Stat5 and the tyrosine-phosphorylated receptors for erythropoietin and interleukin-3. *Blood* 88, 4415–4425.
- Choesmel, V., Bacqueville, D., Rouquette, J., Noaillac-Depeyre, J., Fribourg, S., Crétien, A., Leblanc, T., Tchernia, G., Da Costa, L., and Gleizes, P.-E. (2007). Impaired ribosome biogenesis in Diamond-Blackfan anemia. *Blood* 109, 1275–1283.
- Claessens, Y.-E., Bouscary, D., Dupont, J.-M., Picard, F., Melle, J., Gisselbrecht, S., Lacombe, C., Dreyfus, F., Mayeux, P., and Fontenay-Roupie, M. (2002). In vitro proliferation and differentiation of erythroid progenitors from patients with myelodysplastic syndromes: evidence for Fas-dependent apoptosis. *Blood* 99, 1594–1601.
- Claessens, Y.-E., Park, S., Dubart-Kupperschmitt, A., Mariot, V., Garrido, C., Chrétien, S., Dreyfus, F., Lacombe, C., Mayeux, P., and Fontenay, M. (2005). Rescue of early-stage myelodysplastic syndrome-deriving erythroid precursors by the ectopic expression of a dominant-negative form of FADD. *Blood* 105, 4035–4042.
- Cmejla, R., Cmejlova, J., Handrkova, H., Petrak, J., and Pospisilova, D. (2007). Ribosomal protein S17 gene (RPS17) is mutated in Diamond-Blackfan anemia. *Hum. Mutat.* 28, 1178–1182.
- Conconi, A., Widmer, R.M., Koller, T., and Sogo, J.M. (1989). Two different chromatin structures coexist in ribosomal RNA genes throughout the cell cycle. *Cell* 57, 753–761.
- Constantinescu, S.N., Keren, T., Socolovsky, M., Nam, H., Henis, Y.I., and Lodish, H.F. (2001). Ligand-independent oligomerization of cell-surface erythropoietin receptor is mediated by the transmembrane domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 4379–4384.
- Corless, C.L., and Heinrich, M.C. (2008). Molecular pathobiology of gastrointestinal stromal sarcomas. *Annu Rev Pathol* 3, 557–586.

Corless, C.L., Barnett, C.M., and Heinrich, M.C. (2011). Gastrointestinal stromal tumours: origin and molecular oncology. *Nat. Rev. Cancer* 11, 865–878.

Cortelezzi, A., Cattaneo, C., Cristiani, S., Sarina, B., Pomati, M., Silvestris, I., Ibatci, A., and Maiolo, A.T. (1999). Low plasma stem cell factor levels correlate with in vitro leukemic growth in myelodysplastic syndromes. *Leuk. Res.* 23, 271–275.

Crosier, P.S., Ricciardi, S.T., Hall, L.R., Vitas, M.R., Clark, S.C., and Crosier, K.E. (1993). Expression of isoforms of the human receptor tyrosine kinase c-kit in leukemic cell lines and acute myeloid leukemia. *Blood* 82, 1151–1158.

-D-

D’Andrea, A.D., Lodish, H.F., and Wong, G.G. (1989). Expression cloning of the murine erythropoietin receptor. *Cell* 57, 277–285.

Dai, M.-S., and Lu, H. (2004). Inhibition of MDM2-mediated p53 ubiquitination and degradation by ribosomal protein L5. *J. Biol. Chem.* 279, 44475–44482.

Deberry, C., Mou, S., and Linnekin, D. (1997). Stat1 associates with c-kit and is activated in response to stem cell factor. *Biochem. J.* 327 (Pt 1), 73–80.

Demetri, G.D., Von Mehren, M., Blanke, C.D., Van den Abbeele, A.D., Eisenberg, B., Roberts, P.J., Heinrich, M.C., Tuveson, D.A., Singer, S., Janicek, M., et al. (2002). Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N. Engl. J. Med.* 347, 472–480.

Deng, W., Lu, C., Zhu, G., Lin, Q., and Feng, P. (2005). [A novel KIT gene mutation results in piebaldism]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 22, 545–547.

Derenzini, M., Pasquinelli, G., O’Donohue, M.-F., Ploton, D., and Thiry, M. (2006). Structural and functional organization of ribosomal genes within the mammalian cell nucleolus. *J. Histochem. Cytochem.* 54, 131–145.

DiNitto, J.P., Deshmukh, G.D., Zhang, Y., Jacques, S.L., Coli, R., Worrall, J.W., Diehl, W., English, J.M., and Wu, J.C. (2010). Function of activation loop tyrosine phosphorylation in the mechanism of c-Kit auto-activation and its implication in sunitinib resistance. *J. Biochem.* 147, 601–609.

Diwan, A., Koesters, A.G., Odley, A.M., Pushkaran, S., Baines, C.P., Spike, B.T., Daria, D., Jegga, A.G., Geiger, H., Aronow, B.J., et al. (2007). Unrestrained erythroblast development in Nix^{-/-} mice reveals a mechanism for apoptotic modulation of erythropoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 6794–6799.

Dolznic, H., Boulmé, F., Stangl, K., Deiner, E.M., Mikulits, W., Beug, H., and Müllner, E.W. (2001). Establishment of normal, terminally differentiating mouse erythroid progenitors: molecular characterization by cDNA arrays. *FASEB J.* 15, 1442–1444.

Dolznic, H., Grebien, F., Sauer, T., Beug, H., and Müllner, E.W. (2004). Evidence for a size-sensing mechanism in animal cells. *Nat. Cell Biol.* 6, 899–905.

Dousset, T., Wang, C., Verheggen, C., Chen, D., Hernandez-Verdun, D., and Huang, S. (2000). Initiation of nucleolar assembly is independent of RNA polymerase I transcription. *Mol. Biol. Cell* 11, 2705–2717.

Downing, J.R. (1999). The AML1-ETO chimaeric transcription factor in acute myeloid leukaemia: biology and clinical significance. *Br. J. Haematol.* 106, 296–308.

Draptchinskaia, N., Gustavsson, P., Andersson, B., Pettersson, M., Willig, T.N., Dianzani, I., Ball, S., Tchernia, G., Klar, J., Matsson, H., et al. (1999). The gene encoding ribosomal protein S19 is mutated in Diamond-Blackfan anaemia. *Nat. Genet.* 21, 169–175.

Drygin, D., Lin, A., Bliesath, J., Ho, C.B., O'Brien, S.E., Proffitt, C., Omori, M., Haddach, M., Schwaebe, M.K., Siddiqui-Jain, A., et al. (2011). Targeting RNA polymerase I with an oral small molecule CX-5461 inhibits ribosomal RNA synthesis and solid tumor growth. *Cancer Res.* 71, 1418–1430.

Duan, J., Ba, Q., Wang, Z., Hao, M., Li, X., Hu, P., Zhang, D., Zhang, R., and Wang, H. (2011). Knockdown of ribosomal protein S7 causes developmental abnormalities via p53 dependent and independent pathways in zebrafish. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43, 1218–1227.

Duensing, A., Medeiros, F., McConarty, B., Joseph, N.E., Panigrahy, D., Singer, S., Fletcher, C.D.M., Demetri, G.D., and Fletcher, J.A. (2004). Mechanisms of oncogenic KIT signal transduction in primary gastrointestinal stromal tumors (GISTs). *Oncogene* 23, 3999–4006.

Dundr, M., and Olson, M.O. (1998). Partially processed pre-rRNA is preserved in association with processing components in nucleolus-derived foci during mitosis. *Mol. Biol. Cell* 9, 2407–2422.

Dundr, M., Misteli, T., and Olson, M.O. (2000). The dynamics of postmitotic reassembly of the nucleolus. *J. Cell Biol.* 150, 433–446.

Dutt, S., Narla, A., Lin, K., Mullally, A., Abayasekara, N., Megerdichian, C., Wilson, F.H., Currie, T., Khanna-Gupta, A., Berliner, N., et al. (2011). Haploinsufficiency for ribosomal protein genes causes selective activation of p53 in human erythroid progenitor cells. *Blood* 117, 2567–2576.

-E-

Ebert, B.L., Pretz, J., Bosco, J., Chang, C.Y., Tamayo, P., Galili, N., Raza, A., Root, D.E., Attar, E., Ellis, S.R., et al. (2008). Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen. *Nature* 451, 335–339.

Endo, T., Odb, A., Satoh, I., Haseyama, Y., Nishio, M., Koizumi, K., Takashima, H., Fujimoto, K., Amasaki, Y., Fujita, H., et al. (2001). Stem cell factor protects c-kit⁺ human primary erythroid cells from apoptosis. *Exp. Hematol.* 29, 833–841.

Engström, M., Karlsson, R., and Jönsson, J.-I. (2003). Inactivation of the forkhead transcription factor FoxO3 is essential for PKB-mediated survival of hematopoietic progenitor cells by kit ligand. *Exp. Hematol.* *31*, 316–323.

Escribano, L., Ocqueteau, M., Almeida, J., Orfao, A., and San Miguel, J.F. (1998). Expression of the c-kit (CD117) molecule in normal and malignant hematopoiesis. *Leuk. Lymphoma* *30*, 459–466.

-F-

Farini, D., La Sala, G., Tedesco, M., and De Felici, M. (2007). Chemoattractant action and molecular signaling pathways of Kit ligand on mouse primordial germ cells. *Dev. Biol.* *306*, 572–583.

Farrar, J.E., Nater, M., Caywood, E., McDevitt, M.A., Kowalski, J., Takemoto, C.M., Talbot, C.C., Jr, Meltzer, P., Esposito, D., Beggs, A.H., et al. (2008). Abnormalities of the large ribosomal subunit protein, Rpl35a, in Diamond-Blackfan anemia. *Blood* *112*, 1582–1592.

La Ferla, K., Reimann, C., Jelkmann, W., and Hellwig-Bürgel, T. (2002). Inhibition of erythropoietin gene expression signaling involves the transcription factors GATA-2 and NF-kappaB. *FASEB J.* *16*, 1811–1813.

Finger, C., Escher, C., and Schneider, D. (2009). The single transmembrane domains of human receptor tyrosine kinases encode self-interactions. *Sci Signal* *2*, ra56.

Flanagan, J.G., Chan, D.C., and Leder, P. (1991). Transmembrane form of the kit ligand growth factor is determined by alternative splicing and is missing in the *Sld* mutant. *Cell* *64*, 1025–1035.

Fomproix, N., Gébrane-Younès, J., and Hernandez-Verdun, D. (1998). Effects of anti-fibrillarin antibodies on building of functional nucleoli at the end of mitosis. *J. Cell. Sci.* *111 (Pt 3)*, 359–372.

Foster, R., Griffith, R., Ferrao, P., and Ashman, L. (2004). Molecular basis of the constitutive activity and STI571 resistance of Asp816Val mutant KIT receptor tyrosine kinase. *J. Mol. Graph. Model.* *23*, 139–152.

Frisan, E., Pawlikowska, P., Pierre-Eugène, C., Viallon, V., Gibault, L., Park, S., Mayeux, P., Dreyfus, F., Porteu, F., and Fontenay, M. (2010). p-ERK1/2 is a predictive factor of response to erythropoiesis-stimulating agents in low/int-1 myelodysplastic syndromes. *Haematologica* *95*, 1964–1968.

Frisan, E., Vandekerckhove, J., De Thonel, A., Pierre-Eugène, C., Sternberg, A., Arlet, J.-B., Floquet, C., Gyan, E., Kosmider, O., Dreyfus, F., et al. (2012). Defective nuclear localization of Hsp70 is associated with dyserythropoiesis and GATA-1 cleavage in myelodysplastic syndromes. *Blood* *119*, 1532–1542.

Frost, M.J., Ferrao, P.T., Hughes, T.P., and Ashman, L.K. (2002). Juxtamembrane mutant V560GKit is more sensitive to Imatinib (STI571) compared with wild-type c-kit whereas the kinase domain mutant D816VKit is resistant. *Mol. Cancer Ther.* **1**, 1115–1124.

Fumagalli, S., Di Cara, A., Neb-Gulati, A., Natt, F., Schwemberger, S., Hall, J., Babcock, G.F., Bernardi, R., Pandolfi, P.P., and Thomas, G. (2009). Absence of nucleolar disruption after impairment of 40S ribosome biogenesis reveals an rpL11-translation-dependent mechanism of p53 induction. *Nat. Cell Biol.* **11**, 501–508.

-G-

Gabillot-Carré, M., Lepelletier, Y., Humbert, M., De Sepuvelde, P., Hamouda, N.B., Zappulla, J.P., Liblau, R., Ribadeau-Dumas, A., Machavoine, F., Letard, S., et al. (2006). Rapamycin inhibits growth and survival of D816V-mutated c-kit mast cells. *Blood* **108**, 1065–1072.

Galli, S.J., Tsai, M., Wershil, B.K., Tam, S.Y., and Costa, J.J. (1995). Regulation of mouse and human mast cell development, survival and function by stem cell factor, the ligand for the c-kit receptor. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **107**, 51–53.

Gazda, H.T., Grabowska, A., Merida-Long, L.B., Latawiec, E., Schneider, H.E., Lipton, J.M., Vlachos, A., Atsidaftos, E., Ball, S.E., Orfali, K.A., et al. (2006). Ribosomal protein S24 gene is mutated in Diamond-Blackfan anemia. *Am. J. Hum. Genet.* **79**, 1110–1118.

Gazda, H.T., Sheen, M.R., Vlachos, A., Choesmel, V., O'Donohue, M.-F., Schneider, H., Darras, N., Hasman, C., Sieff, C.A., Newburger, P.E., et al. (2008). Ribosomal protein L5 and L11 mutations are associated with cleft palate and abnormal thumbs in Diamond-Blackfan anemia patients. *Am. J. Hum. Genet.* **83**, 769–780.

Geissler, E.N., Ryan, M.A., and Housman, D.E. (1988). The dominant-white spotting (W) locus of the mouse encodes the c-kit proto-oncogene. *Cell* **55**, 185–192.

Geissler, E.N., Liao, M., Brook, J.D., Martin, F.H., Zsebo, K.M., Housman, D.E., and Galli, S.J. (1991). Stem cell factor (SCF), a novel hematopoietic growth factor and ligand for c-kit tyrosine kinase receptor, maps on human chromosome 12 between 12q14.3 and 12qter. *Somat. Cell Mol. Genet.* **17**, 207–214.

Giebel, L.B., Strunk, K.M., Holmes, S.A., and Spritz, R.A. (1992). Organization and nucleotide sequence of the human KIT (mast/stem cell growth factor receptor) proto-oncogene. *Oncogene* **7**, 2207–2217.

Gleizes, P.E., Noaillac-Depeyre, J., Léger-Silvestre, I., Teulières, F., Dauxois, J.Y., Pommet, D., Azum-Gelade, M.C., and Gas, N. (2001). Ultrastructural localization of rRNA shows defective nuclear export of preribosomes in mutants of the Nup82p complex. *J. Cell Biol.* **155**, 923–936.

Gommerman, J.L., Rottapel, R., and Berger, S.A. (1997). Phosphatidylinositol 3-kinase and Ca²⁺ influx dependence for ligand-stimulated internalization of the c-Kit receptor. *J. Biol. Chem.* **272**, 30519–30525.

Gotoh, A., Takahira, H., Mantel, C., Litz-Jackson, S., Boswell, H.S., and Broxmeyer, H.E. (1996). Steel factor induces serine phosphorylation of Stat3 in human growth factor-dependent myeloid cell lines. *Blood* 88, 138–145.

Greenberg, P.L., Tuechler, H., Schanz, J., Sanz, G., Garcia-Manero, G., Solé, F., Bennett, J.M., Bowen, D., Fenaux, P., Dreyfus, F., et al. (2012). Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood* 120, 2454–2465.

Gu, J., Nie, L., Wiederschain, D., and Yuan, Z.M. (2001). Identification of p53 sequence elements that are required for MDM2-mediated nuclear export. *Mol. Cell. Biol.* 21, 8533–8546.

Gu, Y., Runyan, C., Shoemaker, A., Surani, A., and Wylie, C. (2009). Steel factor controls primordial germ cell survival and motility from the time of their specification in the allantois, and provides a continuous niche throughout their migration. *Development* 136, 1295–1303.

Guerrini, F., Galimberti, S., Ciabatti, E., Brizzi, S., Testi, R., Pollastrini, A., Falini, B., and Petrini, M. (2007). Molecular detection of GNNK- and GNNK+ c-kit isoforms: a new tool for risk stratification in adult acute myeloid leukaemia. *Leukemia* 21, 2056–2058.

Guillard, C., Chrétien, S., Jockers, R., Fichelson, S., Mayeux, P., and Duprez, V. (2001). Coupling of heterotrimeric Gi proteins to the erythropoietin receptor. *J. Biol. Chem.* 276, 2007–2014.

Guillard, C., Chrétien, S., Pelus, A.-S., Porteu, F., Muller, O., Mayeux, P., and Duprez, V. (2003). Activation of the mitogen-activated protein kinases Erk1/2 by erythropoietin receptor via a G(i) protein beta gamma-subunit-initiated pathway. *J. Biol. Chem.* 278, 11050–11056.

-H-

Hachiya, A., Sriwiriyanont, P., Kobayashi, T., Nagasawa, A., Yoshida, H., Ohuchi, A., Kitahara, T., Visscher, M.O., Takema, Y., Tsuboi, R., et al. (2009). Stem cell factor-KIT signalling plays a pivotal role in regulating pigmentation in mammalian hair. *J. Pathol.* 218, 30–39.

Hadjiolova, K.V., Nicoloso, M., Mazan, S., Hadjiolov, A.A., and Bachellerie, J.P. (1993). Alternative pre-rRNA processing pathways in human cells and their alteration by cycloheximide inhibition of protein synthesis. *Eur. J. Biochem.* 212, 211–215.

Hanspal, M., and Hanspal, J.S. (1994). The association of erythroblasts with macrophages promotes erythroid proliferation and maturation: a 30-kD heparin-binding protein is involved in this contact. *Blood* 84, 3494–3504.

Hanspal, M., Smockova, Y., and Uong, Q. (1998). Molecular identification and functional characterization of a novel protein that mediates the attachment of erythroblasts to macrophages. *Blood* 92, 2940–2950.

Harir, N., Pecquet, C., Kerenyi, M., Sonneck, K., Kovacic, B., Nyga, R., Brevet, M., Dhennin, I., Gouilleux-Gruart, V., Beug, H., et al. (2007). Constitutive activation of Stat5 promotes its

cytoplasmic localization and association with PI3-kinase in myeloid leukemias. *Blood* 109, 1678–1686.

Harir, N., Boudot, C., Friedbichler, K., Sonneck, K., Kondo, R., Martin-Lannerée, S., Kenner, L., Kerenyi, M., Yahiaoui, S., Gouilleux-Gruart, V., et al. (2008). Oncogenic Kit controls neoplastic mast cell growth through a Stat5/PI3-kinase signaling cascade. *Blood* 112, 2463–2473.

Hayashi, S., Kunisada, T., Ogawa, M., Yamaguchi, K., and Nishikawa, S. (1991). Exon skipping by mutation of an authentic splice site of c-kit gene in W/W mouse. *Nucleic Acids Res.* 19, 1267–1271.

Heinrich, M.C., Griffith, D.J., Druker, B.J., Wait, C.L., Ott, K.A., and Zigler, A.J. (2000). Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI 571, a selective tyrosine kinase inhibitor. *Blood* 96, 925–932.

Herbst, R., Lammers, R., Schlessinger, J., and Ullrich, A. (1991). Substrate phosphorylation specificity of the human c-kit receptor tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 266, 19908–19916.

Hernandez-Verdun, D., and Gautier, T. (1994). The chromosome periphery during mitosis. *Bioessays* 16, 179–185.

Hernandez-Verdun, D., and Louvet, E. (2004). [The nucleolus: structure, functions, and associated diseases]. *Med Sci (Paris)* 20, 37–44.

Hernandez-Verdun, D., and Roussel, P. (2003). Regulators of nucleolar functions. *Prog Cell Cycle Res* 5, 301–308.

Hibi, K., Takahashi, T., Sekido, Y., Ueda, R., Hida, T., Ariyoshi, Y., Takagi, H., and Takahashi, T. (1991). Coexpression of the stem cell factor and the c-kit genes in small-cell lung cancer. *Oncogene* 6, 2291–2296.

Hiebert, S.W., Lutterbach, B., and Amann, J. (2001). Role of co-repressors in transcriptional repression mediated by the t(8;21), t(16;21), t(12;21), and inv(16) fusion proteins. *Curr. Opin. Hematol.* 8, 197–200.

Hines, S.J., Litz, J.S., and Krystal, G.W. (1999). Coexpression of c-kit and stem cell factor in breast cancer results in enhanced sensitivity to members of the EGF family of growth factors. *Breast Cancer Res. Treat.* 58, 1–10.

Hirota, S., Isozaki, K., Moriyama, Y., Hashimoto, K., Nishida, T., Ishiguro, S., Kawano, K., Hanada, M., Kurata, A., Takeda, M., et al. (1998). Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 279, 577–580.

Hölzel, M., Orban, M., Hochstatter, J., Rohrmoser, M., Harasim, T., Malamoussi, A., Kremmer, E., Längst, G., and Eick, D. (2010). Defects in 18 S or 28 S rRNA processing activate the p53 pathway. *J. Biol. Chem.* 285, 6364–6370.

Hong, L., Munugalavadla, V., and Kapur, R. (2004). c-Kit-mediated overlapping and unique functional and biochemical outcomes via diverse signaling pathways. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 1401–1410.

Hu, J., Liu, J., Xue, F., Halverson, G., Reid, M., Guo, A., Chen, L., Raza, A., Galili, N., Jaffray, J., et al. (2013). Isolation and functional characterization of human erythroblasts at distinct stages: implications for understanding of normal and disordered erythropoiesis in vivo. *Blood* **121**, 3246–3253.

Huang, E., Nocka, K., Beier, D.R., Chu, T.Y., Buck, J., Lahm, H.W., Wellner, D., Leder, P., and Besmer, P. (1990). The hematopoietic growth factor KL is encoded by the *Sl* locus and is the ligand of the c-kit receptor, the gene product of the *W* locus. *Cell* **63**, 225–233.

Huang, L.J., Constantinescu, S.N., and Lodish, H.F. (2001). The N-terminal domain of Janus kinase 2 is required for Golgi processing and cell surface expression of erythropoietin receptor. *Mol. Cell* **8**, 1327–1338.

Hubbard, S.R. (2004). Juxtamembrane autoinhibition in receptor tyrosine kinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 464–471.

Hundley, T.R., Gilfillan, A.M., Tkaczyk, C., Andrade, M.V., Metcalfe, D.D., and Beaven, M.A. (2004). Kit and FcεpsilonRI mediate unique and convergent signals for release of inflammatory mediators from human mast cells. *Blood* **104**, 2410–2417.

-|-

Iemura, A., Tsai, M., Ando, A., Wershil, B.K., and Galli, S.J. (1994). The c-kit ligand, stem cell factor, promotes mast cell survival by suppressing apoptosis. *Am. J. Pathol.* **144**, 321–328.

Ihle, J.N., Quelle, F.W., and Miura, O. (1993). Signal transduction through the receptor for erythropoietin. *Semin. Immunol.* **5**, 375–389.

Imagawa, S., Yamamoto, M., and Miura, Y. (1997). Negative regulation of the erythropoietin gene expression by the GATA transcription factors. *Blood* **89**, 1430–1439.

-J-

Jacobs, K., Shoemaker, C., Rudersdorf, R., Neill, S.D., Kaufman, R.J., Mufson, A., Seehra, J., Jones, S.S., Hewick, R., and Fritsch, E.F. (1985). Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature* **313**, 806–810.

Jacobs-Helber, S.M., Penta, K., Sun, Z., Lawson, A., and Sawyer, S.T. (1997). Distinct signaling from stem cell factor and erythropoietin in HCD57 cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 6850–6853.

Janssen, J.W., Buschle, M., Layton, M., Drexler, H.G., Lyons, J., Van den Berghe, H., Heimpel, H., Kubanek, B., Kleihauer, E., and Mufti, G.J. (1989). Clonal analysis of myelodysplastic syndromes: evidence of multipotent stem cell origin. *Blood* **73**, 248–254.

Jiao, H., Berrada, K., Yang, W., Tabrizi, M., Platanias, L.C., and Yi, T. (1996). Direct association with and dephosphorylation of Jak2 kinase by the SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1. *Mol. Cell. Biol.* 16, 6985–6992.

Jin, A., Itahana, K., O’Keefe, K., and Zhang, Y. (2004). Inhibition of HDM2 and activation of p53 by ribosomal protein L23. *Mol. Cell. Biol.* 24, 7669–7680.

Joensuu, H., Roberts, P.J., Sarlomo-Rikala, M., Andersson, L.C., Tervahartiala, P., Tuveson, D., Silberman, S., Capdeville, R., Dimitrijevic, S., Druker, B., et al. (2001). Effect of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in a patient with a metastatic gastrointestinal stromal tumor. *N. Engl. J. Med.* 344, 1052–1056.

Jones, S.S., D’Andrea, A.D., Haines, L.L., and Wong, G.G. (1990). Human erythropoietin receptor: cloning, expression, and biologic characterization. *Blood* 76, 31–35.

Juban, G., Giraud, G., Guyot, B., Belin, S., Diaz, J.-J., Starck, J., Guillouf, C., Moreau-Gachelin, F., and Morlé, F. (2009). Spi-1 and Fli-1 directly activate common target genes involved in ribosome biogenesis in Friend erythroleukemic cells. *Mol. Cell. Biol.* 29, 2852–2864.

Juul, S.E., Yachnis, A.T., Rojiani, A.M., and Christensen, R.D. (1999). Immunohistochemical localization of erythropoietin and its receptor in the developing human brain. *Pediatr. Dev. Pathol.* 2, 148–158.

-K-

Kissel, H., Timokhina, I., Hardy, M.P., Rothschild, G., Tajima, Y., Soares, V., Angeles, M., Whitlow, S.R., Manova, K., and Besmer, P. (2000). Point mutation in kit receptor tyrosine kinase reveals essential roles for kit signaling in spermatogenesis and oogenesis without affecting other kit responses. *EMBO J.* 19, 1312–1326.

Klingmüller, U., Lorenz, U., Cantley, L.C., Neel, B.G., and Lodish, H.F. (1995). Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell* 80, 729–738.

Koberna, K., Malínský, J., Pliss, A., Masata, M., Vecerova, J., Fialová, M., Bednár, J., and Raska, I. (2002). Ribosomal genes in focus: new transcripts label the dense fibrillar components and form clusters indicative of “Christmas trees” in situ. *J. Cell Biol.* 157, 743–748.

Kodama, H., Nose, M., Niida, S., Nishikawa, S., and Nishikawa, S. (1994). Involvement of the c-kit receptor in the adhesion of hematopoietic stem cells to stromal cells. *Exp. Hematol.* 22, 979–984.

Kohl, T.M., Schnittger, S., Ellwart, J.W., Hiddemann, W., and Spiekermann, K. (2005). KIT exon 8 mutations associated with core-binding factor (CBF)-acute myeloid leukemia (AML) cause hyperactivation of the receptor in response to stem cell factor. *Blood* 105, 3319–3321.

Kon, S., Minegishi, N., Tanabe, K., Watanabe, T., Funaki, T., Wong, W.F., Sakamoto, D., Higuchi, Y., Kiyonari, H., Asano, K., et al. (2013). Smap1 deficiency perturbs receptor trafficking and predisposes mice to myelodysplasia. *J. Clin. Invest.* **123**, 1123–1137.

Konstantinidis, D.G., Pushkaran, S., Johnson, J.F., Cancelas, J.A., Manganaris, S., Harris, C.E., Williams, D.A., Zheng, Y., and Kalfa, T.A. (2012). Signaling and cytoskeletal requirements in erythroblast enucleation. *Blood* **119**, 6118–6127.

Koury, S.T., Koury, M.J., and Bondurant, M.C. (1988). Morphological changes in erythroblasts during erythropoietin-induced terminal differentiation in vitro. *Exp. Hematol.* **16**, 758–763.

Koury, S.T., Bondurant, M.C., Koury, M.J., and Semenza, G.L. (1991). Localization of cells producing erythropoietin in murine liver by in situ hybridization. *Blood* **77**, 2497–2503.

Koury, S.T., Bondurant, M.C., Semenza, G.L., and Koury, M.J. (1993). The use of in situ hybridization to study erythropoietin gene expression in murine kidney and liver. *Microsc. Res. Tech.* **25**, 29–39.

Kovach, N.L., Lin, N., Yednock, T., Harlan, J.M., and Broudy, V.C. (1995). Stem cell factor modulates avidity of alpha 4 beta 1 and alpha 5 beta 1 integrins expressed on hematopoietic cell lines. *Blood* **85**, 159–167.

Kozlowski, M., Larose, L., Lee, F., Le, D.M., Rottapel, R., and Siminovitch, K.A. (1998). SHP-1 binds and negatively modulates the c-Kit receptor by interaction with tyrosine 569 in the c-Kit juxtamembrane domain. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 2089–2099.

Krystal, G.W., Hines, S.J., and Organ, C.P. (1996). Autocrine growth of small cell lung cancer mediated by coexpression of c-kit and stem cell factor. *Cancer Res.* **56**, 370–376.

Kundu, M. (2011). ULK1, mammalian target of rapamycin, and mitochondria: linking nutrient availability and autophagy. *Antioxid. Redox Signal.* **14**, 1953–1958.

Kundu, M., Lindsten, T., Yang, C.-Y., Wu, J., Zhao, F., Zhang, J., Selak, M.A., Ney, P.A., and Thompson, C.B. (2008). Ulk1 plays a critical role in the autophagic clearance of mitochondria and ribosomes during reticulocyte maturation. *Blood* **112**, 1493–1502.

-L-

Lacombe, C., Da Silva, J.L., Bruneval, P., Fournier, J.G., Wendling, F., Casadevall, N., Camilleri, J.P., Bariety, J., Varet, B., and Tambourin, P. (1988). Peritubular cells are the site of erythropoietin synthesis in the murine hypoxic kidney. *J. Clin. Invest.* **81**, 620–623.

Lane, D.P. (1992). Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* **358**, 15–16.

Lasota, J., Kopczynski, J., Majidi, M., Miettinen, M., and Sarlomo-Rikala, M. (2002). Apparent KIT Ser(715) deletion in GIST mRNA is not detectable in genomic DNA and represents a previously known splice variant of KIT transcript. *Am. J. Pathol.* **161**, 739–741.

- Lee, G., Lo, A., Short, S.A., Mankelow, T.J., Spring, F., Parsons, S.F., Yazdanbakhsh, K., Mohandas, N., Anstee, D.J., and Chasis, J.A. (2006). Targeted gene deletion demonstrates that the cell adhesion molecule ICAM-4 is critical for erythroblastic island formation. *Blood* 108, 2064–2071.
- Lemmon, M.A., and Schlessinger, J. (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 141, 1117–1134.
- Lemmon, M.A., Pinchasi, D., Zhou, M., Lax, I., and Schlessinger, J. (1997). Kit receptor dimerization is driven by bivalent binding of stem cell factor. *J. Biol. Chem.* 272, 6311–6317.
- Lennartsson, J., and Rönstrand, L. (2012). Stem cell factor receptor/c-Kit: from basic science to clinical implications. *Physiol. Rev.* 92, 1619–1649.
- Lennartsson, J., Blume-Jensen, P., Hermanson, M., Pontén, E., Carlberg, M., and Rönstrand, L. (1999). Phosphorylation of Shc by Src family kinases is necessary for stem cell factor receptor/c-kit mediated activation of the Ras/MAP kinase pathway and c-fos induction. *Oncogene* 18, 5546–5553.
- Lennartsson, J., Jelacic, T., Linnekin, D., and Shivakrupa, R. (2005). Normal and oncogenic forms of the receptor tyrosine kinase kit. *Stem Cells* 23, 16–43.
- Leung, A.K.L., Gerlich, D., Miller, G., Lyon, C., Lam, Y.W., Lleres, D., Daigle, N., Zomerdijs, J., Ellenberg, J., and Lamond, A.I. (2004). Quantitative kinetic analysis of nucleolar breakdown and reassembly during mitosis in live human cells. *J. Cell Biol.* 166, 787–800.
- Lévesque, J.P., Leavesley, D.I., Niutta, S., Vadas, M., and Simmons, P.J. (1995). Cytokines increase human hemopoietic cell adhesiveness by activation of very late antigen (VLA)-4 and VLA-5 integrins. *J. Exp. Med.* 181, 1805–1815.
- Levine, A.J., and Oren, M. (2009). The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat. Rev. Cancer* 9, 749–758.
- Likovský, Z., Peterka, M., and Peterková, R. (1994). Development of nucleolar apparatus in the chick primitive erythroid cells. *Anat. Embryol.* 189, 539–544.
- Lim, K.-H., Tefferi, A., Lasho, T.L., Finke, C., Patnaik, M., Butterfield, J.H., McClure, R.F., Li, C.-Y., and Pardanani, A. (2009). Systemic mastocytosis in 342 consecutive adults: survival studies and prognostic factors. *Blood* 113, 5727–5736.
- Lin, F.K., Suggs, S., Lin, C.H., Browne, J.K., Smalling, R., Egrie, J.C., Chen, K.K., Fox, G.M., Martin, F., and Stabinsky, Z. (1985). Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 7580–7584.
- Linnekin, D., Evans, G.A., D’Andrea, A., and Farrar, W.L. (1992). Association of the erythropoietin receptor with protein tyrosine kinase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 6237–6241.

Linnekin, D., Weiler, S.R., Mou, S., DeBerry, C.S., Keller, J.R., Ruscetti, F.W., Ferris, D.K., and Longo, D.L. (1996). JAK2 is constitutively associated with c-Kit and is phosphorylated in response to stem cell factor. *Acta Haematol.* 95, 224–228.

Livnah, O., Stura, E.A., Middleton, S.A., Johnson, D.L., Jolliffe, L.K., and Wilson, I.A. (1999). Crystallographic evidence for preformed dimers of erythropoietin receptor before ligand activation. *Science* 283, 987–990.

Lohrum, M.A.E., Ludwig, R.L., Kubbutat, M.H.G., Hanlon, M., and Vousden, K.H. (2003). Regulation of HDM2 activity by the ribosomal protein L11. *Cancer Cell* 3, 577–587.

Longley, B.J., Jr, Metcalfe, D.D., Tharp, M., Wang, X., Tyrrell, L., Lu, S.Z., Heitjan, D., and Ma, Y. (1999). Activating and dominant inactivating c-KIT catalytic domain mutations in distinct clinical forms of human mastocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 1609–1614.

Longmore, G.D., and Lodish, H.F. (1991). An activating mutation in the murine erythropoietin receptor induces erythroleukemia in mice: a cytokine receptor superfamily oncogene. *Cell* 67, 1089–1102.

Longmore, G.D., Pharr, P., Neumann, D., and Lodish, H.F. (1993). Both megakaryocytopoiesis and erythropoiesis are induced in mice infected with a retrovirus expressing an oncogenic erythropoietin receptor. *Blood* 82, 2386–2395.

Longmore, G.D., Pharr, P.N., and Lodish, H.F. (1994). A constitutively activated erythropoietin receptor stimulates proliferation and contributes to transformation of multipotent, committed nonerythroid and erythroid progenitor cells. *Mol. Cell. Biol.* 14, 2266–2277.

Lu, L., Heinrich, M.C., Wang, L.S., Dai, M.S., Zigler, A.J., Chai, L., and Broxmeyer, H.E. (1999). Retroviral-mediated gene transduction of c-kit into single hematopoietic progenitor cells from cord blood enhances erythroid colony formation and decreases sensitivity to inhibition by tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta1. *Blood* 94, 2319–2332.

Luo, D., Chen, H., Searles, G., and Jimbow, K. (1995). Coordinated mRNA expression of c-Kit with tyrosinase and TRP-1 in melanin pigmentation of normal and malignant human melanocytes and transient activation of tyrosinase by Kit/SCF-R. *Melanoma Res.* 5, 303–309.

-M-

Ma, X., Lim, U., Park, Y., Mayne, S.T., Wang, R., Hartge, P., Hollenbeck, A.R., and Schatzkin, A. (2009). Obesity, lifestyle factors, and risk of myelodysplastic syndromes in a large US cohort. *Am. J. Epidemiol.* 169, 1492–1499.

Mackenzie, M.A., Jordan, S.A., Budd, P.S., and Jackson, I.J. (1997). Activation of the receptor tyrosine kinase Kit is required for the proliferation of melanoblasts in the mouse embryo. *Dev. Biol.* 192, 99–107.

- Maeda, H., Yamagata, A., Nishikawa, S., Yoshinaga, K., Kobayashi, S., Nishi, K., and Nishikawa, S. (1992). Requirement of c-kit for development of intestinal pacemaker system. *Development* 116, 369–375.
- De Maria, R., Testa, U., Luchetti, L., Zeuner, A., Stassi, G., Pelosi, E., Riccioni, R., Felli, N., Samoggia, P., and Peschle, C. (1999). Apoptotic role of Fas/Fas ligand system in the regulation of erythropoiesis. *Blood* 93, 796–803.
- Martinho, O., Gonçalves, A., Moreira, M.A.R., Ribeiro, L.F.J., Queiroz, G.S., Schmitt, F.C., Reis, R.M., and Longatto-Filho, A. (2008). KIT activation in uterine cervix adenosquamous carcinomas by KIT/SCF autocrine/paracrine stimulation loops. *Gynecol. Oncol.* 111, 350–355.
- Masson, K., Heiss, E., Band, H., and Rönstrand, L. (2006). Direct binding of Cbl to Tyr568 and Tyr936 of the stem cell factor receptor/c-Kit is required for ligand-induced ubiquitination, internalization and degradation. *Biochem. J.* 399, 59–67.
- Matsumoto, A., Masuhara, M., Mitsui, K., Yokouchi, M., Ohtsubo, M., Misawa, H., Miyajima, A., and Yoshimura, A. (1997). CIS, a cytokine inducible SH2 protein, is a target of the JAK-STAT5 pathway and modulates STAT5 activation. *Blood* 89, 3148–3154.
- Maynadié, M., Picard, F., Husson, B., Chatelain, B., Cornet, Y., Le Roux, G., Campos, L., Dromelet, A., Lepelley, P., Jouault, H., et al. (2002). Immunophenotypic clustering of myelodysplastic syndromes. *Blood* 100, 2349–2356.
- McCaffery, P.J., Fraser, J.K., Lin, F.K., and Berridge, M.V. (1989). Subunit structure of the erythropoietin receptor. *J. Biol. Chem.* 264, 10507–10512.
- McGowan, K.A., Pang, W.W., Bhardwaj, R., Perez, M.G., Pluvinae, J.V., Glader, B.E., Malek, R., Mendrysa, S.M., Weissman, I.L., Park, C.Y., et al. (2011). Reduced ribosomal protein gene dosage and p53 activation in low-risk myelodysplastic syndrome. *Blood* 118, 3622–3633.
- Meek, D.W. (1999). Mechanisms of switching on p53: a role for covalent modification? *Oncogene* 18, 7666–7675.
- Mehta, P.A., Harris, R.E., Davies, S.M., Kim, M.-O., Mueller, R., Lampkin, B., Mo, J., Myers, K., and Smolarek, T.A. (2010). Numerical chromosomal changes and risk of development of myelodysplastic syndrome--acute myeloid leukemia in patients with Fanconi anemia. *Cancer Genet. Cytogenet.* 203, 180–186.
- Mekori, Y.A., Oh, C.K., and Metcalfe, D.D. (1995). The role of c-Kit and its ligand, stem cell factor, in mast cell apoptosis. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 107, 136–138.
- Merkwitz, C., Lochhead, P., Tsikolia, N., Koch, D., Sygnecka, K., Sakurai, M., Spanel-Borowski, K., and Ricken, A.M. (2011). Expression of KIT in the ovary, and the role of somatic precursor cells. *Prog Histochem Cytochem* 46, 131–184.
- Meyer, L., Deau, B., Forejtníková, H., Duménil, D., Margottin-Goguet, F., Lacombe, C., Mayeux, P., and Verdier, F. (2007). beta-Trcp mediates ubiquitination and degradation of the erythropoietin receptor and controls cell proliferation. *Blood* 109, 5215–5222.

- Miller, C.P., Heilman, D.W., and Wojchowski, D.M. (2002). Erythropoietin receptor-dependent erythroid colony-forming unit development: capacities of Y343 and phosphotyrosine-null receptor forms. *Blood* 99, 898–904.
- Mithraprabhu, S., and Loveland, K.L. (2009). Control of KIT signalling in male germ cells: what can we learn from other systems? *Reproduction* 138, 743–757.
- Mittelman, M., Gardyn, J., Carmel, M., Malovani, H., Barak, Y., and Nir, U. (1996). Analysis of the erythropoietin receptor gene in patients with myeloproliferative and myelodysplastic syndromes. *Leuk. Res.* 20, 459–466.
- Miura, O., D’Andrea, A., Kabat, D., and Ihle, J.N. (1991). Induction of tyrosine phosphorylation by the erythropoietin receptor correlates with mitogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 11, 4895–4902.
- Miura, O., Nakamura, N., Ihle, J.N., and Aoki, N. (1994). Erythropoietin-dependent association of phosphatidylinositol 3-kinase with tyrosine-phosphorylated erythropoietin receptor. *J. Biol. Chem.* 269, 614–620.
- Miyake, T., Kung, C.K., and Goldwasser, E. (1977). Purification of human erythropoietin. *J. Biol. Chem.* 252, 5558–5564.
- Miyazawa, K., Toyama, K., Gotoh, A., Hendrie, P.C., Mantel, C., and Broxmeyer, H.E. (1994). Ligand-dependent polyubiquitination of c-kit gene product: a possible mechanism of receptor down modulation in M07e cells. *Blood* 83, 137–145.
- Mohandas, N., and Prenant, M. (1978). Three-dimensional model of bone marrow. *Blood* 51, 633–643.
- Mol, C.D., Lim, K.B., Sridhar, V., Zou, H., Chien, E.Y.T., Sang, B.-C., Nowakowski, J., Kassel, D.B., Cronin, C.N., and McRee, D.E. (2003a). Structure of a c-kit product complex reveals the basis for kinase transactivation. *J. Biol. Chem.* 278, 31461–31464.
- Mol, C.D., Lim, K.B., Sridhar, V., Zou, H., Chien, E.Y.T., Sang, B.-C., Nowakowski, J., Kassel, D.B., Cronin, C.N., and McRee, D.E. (2003b). Structure of a c-kit product complex reveals the basis for kinase transactivation. *J. Biol. Chem.* 278, 31461–31464.
- Mol, C.D., Dougan, D.R., Schneider, T.R., Skene, R.J., Kraus, M.L., Scheibe, D.N., Snell, G.P., Zou, H., Sang, B.-C., and Wilson, K.P. (2004). Structural basis for the autoinhibition and STI-571 inhibition of c-Kit tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 279, 31655–31663.
- Mou, S., and Linnekin, D. (1999). Lyn is activated during late G1 of stem-cell-factor-induced cell cycle progression in haemopoietic cells. *Biochem. J.* 342 (Pt 1), 163–170.
- Muro, E., Gébrane-Younis, J., Jobart-Malfait, A., Louvet, E., Roussel, P., and Hernandez-Verdun, D. (2010). The traffic of proteins between nucleolar organizer regions and prenucleolar bodies governs the assembly of the nucleolus at exit of mitosis. *Nucleus* 1, 202–211.

Muta, K., Krantz, S.B., Bondurant, M.C., and Dai, C.H. (1995). Stem cell factor retards differentiation of normal human erythroid progenitor cells while stimulating proliferation. *Blood* 86, 572–580.

-N-

Nakano, M., Satoh, K., Fukumoto, Y., Ito, Y., Kagaya, Y., Ishii, N., Sugamura, K., and Shimokawa, H. (2007). Important role of erythropoietin receptor to promote VEGF expression and angiogenesis in peripheral ischemia in mice. *Circ. Res.* 100, 662–669.

Neubauer, H., Cumano, A., Müller, M., Wu, H., Huffstadt, U., and Pfeffer, K. (1998). Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis. *Cell* 93, 397–409.

Nilsson, L., Astrand-Grundström, I., Arvidsson, I., Jacobsson, B., Hellström-Lindberg, E., Hast, R., and Jacobsen, S.E. (2000). Isolation and characterization of hematopoietic progenitor/stem cells in 5q-deleted myelodysplastic syndromes: evidence for involvement at the hematopoietic stem cell level. *Blood* 96, 2012–2021.

Nilsson, L., Astrand-Grundström, I., Anderson, K., Arvidsson, I., Hokland, P., Bryder, D., Kjeldsen, L., Johansson, B., Hellström-Lindberg, E., Hast, R., et al. (2002). Involvement and functional impairment of the CD34(+)CD38(-)Thy-1(+) hematopoietic stem cell pool in myelodysplastic syndromes with trisomy 8. *Blood* 100, 259–267.

Ning, Z.Q., Li, J., and Arceci, R.J. (2001a). Signal transducer and activator of transcription 3 activation is required for Asp(816) mutant c-Kit-mediated cytokine-independent survival and proliferation in human leukemia cells. *Blood* 97, 3559–3567.

Ning, Z.Q., Li, J., McGuinness, M., and Arceci, R.J. (2001b). STAT3 activation is required for Asp(816) mutant c-Kit induced tumorigenicity. *Oncogene* 20, 4528–4536.

Nishio, M., Oda, A., Koizumi, K., Satoh, I., Sato, Y., Endoh, T., Tsutsumi, A., Fujihara, M., Ikebuchi, K., Ikeda, H., et al. (2001). Stem cell factor prevents Fas-mediated apoptosis of human erythroid precursor cells with Src-family kinase dependency. *Exp. Hematol.* 29, 19–29.

Nucifora, G., and Rowley, J.D. (1994). The AML1 and ETO genes in acute myeloid leukemia with a t(8;21). *Leuk. Lymphoma* 14, 353–362.

-O-

O'Donohue, M.-F., Choesmel, V., Faubladiet, M., Fichant, G., and Gleizes, P.-E. (2010). Functional dichotomy of ribosomal proteins during the synthesis of mammalian 40S ribosomal subunits. *J. Cell Biol.* 190, 853–866.

O'Laughlin-Bunner, B., Radosevic, N., Taylor, M.L., Shivakrupa, DeBerry, C., Metcalfe, D.D., Zhou, M., Lowell, C., and Linnekin, D. (2001). Lyn is required for normal stem cell factor-induced proliferation and chemotaxis of primary hematopoietic cells. *Blood* 98, 343–350.

Ochs, R.L., Lischwe, M.A., Shen, E., Carroll, R.E., and Busch, H. (1985). Nucleologenesis: composition and fate of prenucleolar bodies. *Chromosoma* 92, 330–336.

Ogawa, M., Matsuzaki, Y., Nishikawa, S., Hayashi, S., Kunisada, T., Sudo, T., Kina, T., Nakauchi, H., and Nishikawa, S. (1991). Expression and function of c-kit in hemopoietic progenitor cells. *J. Exp. Med.* 174, 63–71.

Okayama, Y., and Kawakami, T. (2006). Development, migration, and survival of mast cells. *Immunol. Res.* 34, 97–115.

-P-

Papayannopoulou, T., Brice, M., Broudy, V.C., and Zsebo, K.M. (1991). Isolation of c-kit receptor-expressing cells from bone marrow, peripheral blood, and fetal liver: functional properties and composite antigenic profile. *Blood* 78, 1403–1412.

Parker, J.E., Fishlock, K.L., Mijovic, A., Czepulkowski, B., Pagliuca, A., and Mufti, G.J. (1998). “Low-risk” myelodysplastic syndrome is associated with excessive apoptosis and an increased ratio of pro- versus anti-apoptotic bcl-2-related proteins. *Br. J. Haematol.* 103, 1075–1082.

Paronetto, M.P., Farini, D., Sammarco, I., Maturo, G., Vespasiani, G., Geremia, R., Rossi, P., and Sette, C. (2004). Expression of a truncated form of the c-Kit tyrosine kinase receptor and activation of Src kinase in human prostatic cancer. *Am. J. Pathol.* 164, 1243–1251.

Paulson, R.F., Vesely, S., Siminovitch, K.A., and Bernstein, A. (1996). Signalling by the W/Kit receptor tyrosine kinase is negatively regulated in vivo by the protein tyrosine phosphatase Shp1. *Nat. Genet.* 13, 309–315.

Pedersen-Bjergaard, J., Andersen, M.K., Christiansen, D.H., and Nerlov, C. (2002). Genetic pathways in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Blood* 99, 1909–1912.

Pellagatti, A., Hellström-Lindberg, E., Giagounidis, A., Perry, J., Malcovati, L., Della Porta, M.G., Jädersten, M., Killick, S., Fidler, C., Cazzola, M., et al. (2008). Haploinsufficiency of RPS14 in 5q- syndrome is associated with deregulation of ribosomal- and translation-related genes. *Br. J. Haematol.* 142, 57–64.

Pharr, P.N., Hankins, D., Hofbauer, A., Lodish, H.F., and Longmore, G.D. (1993). Expression of a constitutively active erythropoietin receptor in primary hematopoietic progenitors abrogates erythropoietin dependence and enhances erythroid colony-forming unit, erythroid burst-forming unit, and granulocyte/macrophage progenitor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 938–942.

Phung, B., Sun, J., Schepsky, A., Steingrimsson, E., and Rönstrand, L. (2011). C-KIT signaling depends on microphthalmia-associated transcription factor for effects on cell proliferation. *PLoS ONE* 6, e24064.

Piao, X., Curtis, J.E., Minkin, S., Minden, M.D., and Bernstein, A. (1994). Expression of the Kit and KitA receptor isoforms in human acute myelogenous leukemia. *Blood* 83, 476–481.

Pollard, J.A., Alonzo, T.A., Gerbing, R.B., Ho, P.A., Zeng, R., Ravindranath, Y., Dahl, G., Lacayo, N.J., Becton, D., Chang, M., et al. (2010). Prevalence and prognostic significance of KIT mutations in pediatric patients with core binding factor AML enrolled on serial pediatric cooperative trials for de novo AML. *Blood* 115, 2372–2379.

Pugh, C.W., Tan, C.C., Jones, R.W., and Ratcliffe, P.J. (1991). Functional analysis of an oxygen-regulated transcriptional enhancer lying 3' to the mouse erythropoietin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 10553–10557.

Puvion-Dutilleul, F., Mazan, S., Nicoloso, M., Christensen, M.E., and Bachellerie, J.P. (1991). Localization of U3 RNA molecules in nucleoli of HeLa and mouse 3T3 cells by high resolution in situ hybridization. *Eur. J. Cell Biol.* 56, 178–186.

-Q-

Quelle, F.W., Wang, D., Nosaka, T., Thierfelder, W.E., Stravopodis, D., Weinstein, Y., and Ihle, J.N. (1996). Erythropoietin induces activation of Stat5 through association with specific tyrosines on the receptor that are not required for a mitogenic response. *Mol. Cell. Biol.* 16, 1622–1631.

-R-

Raska, I. (2004). Searching for active ribosomal genes. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 35, 23–56.

Raska, I., Shaw, P.J., and Cmarko, D. (2006). Structure and function of the nucleolus in the spotlight. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18, 325–334.

Ray, P., Krishnamoorthy, N., Oriss, T.B., and Ray, A. (2010). Signaling of c-kit in dendritic cells influences adaptive immunity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1183, 104–122.

Raza, A., and Galili, N. (2012). The genetic basis of phenotypic heterogeneity in myelodysplastic syndromes. *Nat. Rev. Cancer* 12, 849–859.

Raza, A., Gezer, S., Mundle, S., Gao, X.Z., Alvi, S., Borok, R., Rifkin, S., Iftikhar, A., Shetty, V., and Parcharidou, A. (1995). Apoptosis in bone marrow biopsy samples involving stromal and hematopoietic cells in 50 patients with myelodysplastic syndromes. *Blood* 86, 268–276.

Reindl, C., Quentmeier, H., Petropoulos, K., Greif, P.A., Benthaus, T., Argiropoulos, B., Mellert, G., Vempati, S., Duyster, J., Buske, C., et al. (2009). CBL exon 8/9 mutants activate the FLT3 pathway and cluster in core binding factor/11q deletion acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome subtypes. *Clin. Cancer Res.* 15, 2238–2247.

Reith, A.D., Ellis, C., Lyman, S.D., Anderson, D.M., Williams, D.E., Bernstein, A., and Pawson, T. (1991). Signal transduction by normal isoforms and W mutant variants of the Kit receptor tyrosine kinase. *EMBO J.* 10, 2451–2459.

Remy, I., Wilson, I.A., and Michnick, S.W. (1999). Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change. *Science* 283, 990–993.

Robinson, M.S. (1994). The role of clathrin, adaptors and dynamin in endocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6, 538–544.

Roskoski, R., Jr (2005). Structure and regulation of Kit protein-tyrosine kinase--the stem cell factor receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338, 1307–1315.

Rossi, P., Marziali, G., Albanesi, C., Charlesworth, A., Geremia, R., and Sorrentino, V. (1992). A novel c-kit transcript, potentially encoding a truncated receptor, originates within a kit gene intron in mouse spermatids. *Dev. Biol.* 152, 203–207.

Rouquette, J., Choesmel, V., and Gleizes, P.-E. (2005). Nuclear export and cytoplasmic processing of precursors to the 40S ribosomal subunits in mammalian cells. *EMBO J.* 24, 2862–2872.

Ryan, J.J., Huang, H., McReynolds, L.J., Shelburne, C., Hu-Li, J., Huff, T.F., and Paul, W.E. (1997). Stem cell factor activates STAT-5 DNA binding in IL-3-derived bone marrow mast cells. *Exp. Hematol.* 25, 357–362.

-S-

Sadahira, Y., Yoshino, T., and Monobe, Y. (1995). Very late activation antigen 4-vascular cell adhesion molecule 1 interaction is involved in the formation of erythroblastic islands. *J. Exp. Med.* 181, 411–415.

Samayawardhena, L.A., Hu, J., Stein, P.L., and Craig, A.W.B. (2006). Fyn kinase acts upstream of Shp2 and p38 mitogen-activated protein kinase to promote chemotaxis of mast cells towards stem cell factor. *Cell. Signal.* 18, 1447–1454.

Sanders, K.M., Ordög, T., Koh, S.D., Torihashi, S., and Ward, S.M. (1999). Development and plasticity of interstitial cells of Cajal. *Neurogastroenterol. Motil.* 11, 311–338.

Sasaki, A., Yasukawa, H., Suzuki, A., Kamizono, S., Syoda, T., Kinjyo, I., Sasaki, M., Johnston, J.A., and Yoshimura, A. (1999). Cytokine-inducible SH2 protein-3 (CIS3/SOCS3) inhibits Janus tyrosine kinase by binding through the N-terminal kinase inhibitory region as well as SH2 domain. *Genes Cells* 4, 339–351.

Sasaki, A., Yasukawa, H., Shouda, T., Kitamura, T., Dikic, I., and Yoshimura, A. (2000). CIS3/SOCS-3 suppresses erythropoietin (EPO) signaling by binding the EPO receptor and JAK2. *J. Biol. Chem.* 275, 29338–29347.

Sasaki, K., Matsumura, G., and Ito, T. (1983). A quantitative morphology of nucleoli of erythroblasts in the mouse spleen: an electron microscopic study. *Arch Histol Jpn* 46, 43–49.

Sato, T., Kim, S., Selleri, C., Young, N.S., and Maciejewski, J.P. (1998). Measurement of secondary colony formation after 5 weeks in long-term cultures in patients with myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 12, 1187–1194.

- Savino, T.M., Bastos, R., Jansen, E., and Hernandez-Verdun, D. (1999). The nucleolar antigen Nop52, the human homologue of the yeast ribosomal RNA processing RRP1, is recruited at late stages of nucleologenesis. *J. Cell. Sci.* **112** (Pt 12), 1889–1900.
- Savino, T.M., Gébrane-Younès, J., De Mey, J., Sibarita, J.B., and Hernandez-Verdun, D. (2001). Nucleolar assembly of the rRNA processing machinery in living cells. *J. Cell Biol.* **153**, 1097–1110.
- Sawada, K., Krantz, S.B., Dai, C.H., Koury, S.T., Horn, S.T., Glick, A.D., and Civin, C.I. (1990). Purification of human blood burst-forming units-erythroid and demonstration of the evolution of erythropoietin receptors. *J. Cell. Physiol.* **142**, 219–230.
- Schanz, J., Steidl, C., Fonatsch, C., Pfeilstöcker, M., Nösslinger, T., Tuechler, H., Valent, P., Hildebrandt, B., Giagounidis, A., Aul, C., et al. (2011). Coalesced multicentric analysis of 2,351 patients with myelodysplastic syndromes indicates an underestimation of poor-risk cytogenetics of myelodysplastic syndromes in the international prognostic scoring system. *J. Clin. Oncol.* **29**, 1963–1970.
- Scheer, U., and Rose, K.M. (1984). Localization of RNA polymerase I in interphase cells and mitotic chromosomes by light and electron microscopic immunocytochemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**, 1431–1435.
- Scheid, M.P., Marignani, P.A., and Woodgett, J.R. (2002). Multiple phosphoinositide 3-kinase-dependent steps in activation of protein kinase B. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 6247–6260.
- Scherl, A., Couté, Y., Déon, C., Callé, A., Kindbeiter, K., Sanchez, J.-C., Greco, A., Hochstrasser, D., and Diaz, J.-J. (2002). Functional proteomic analysis of human nucleolus. *Mol. Biol. Cell* **13**, 4100–4109.
- Schweers, R.L., Zhang, J., Randall, M.S., Loyd, M.R., Li, W., Dorsey, F.C., Kundu, M., Opferman, J.T., Cleveland, J.L., Miller, J.L., et al. (2007). NIX is required for programmed mitochondrial clearance during reticulocyte maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 19500–19505.
- Scott, G., Ewing, J., Ryan, D., and Abboud, C. (1994). Stem cell factor regulates human melanocyte-matrix interactions. *Pigment Cell Res.* **7**, 44–51.
- Semenza, G.L., and Wang, G.L. (1992). A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 5447–5454.
- Shav-Tal, Y., Blechman, J., Darzacq, X., Montagna, C., Dye, B.T., Patton, J.G., Singer, R.H., and Zipori, D. (2005). Dynamic sorting of nuclear components into distinct nucleolar caps during transcriptional inhibition. *Mol. Biol. Cell* **16**, 2395–2413.
- Shaw, P.J., Highett, M.I., Beven, A.F., and Jordan, E.G. (1995). The nucleolar architecture of polymerase I transcription and processing. *EMBO J.* **14**, 2896–2906.

Shingo, T., Sorokan, S.T., Shimazaki, T., and Weiss, S. (2001). Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells. *J. Neurosci.* 21, 9733–9743.

Shivakrupa, R., and Linnekin, D. (2005). Lyn contributes to regulation of multiple Kit-dependent signaling pathways in murine bone marrow mast cells. *Cell. Signal.* 17, 103–109.

Soni, S., Bala, S., Gwynn, B., Sahr, K.E., Peters, L.L., and Hanspal, M. (2006). Absence of erythroblast macrophage protein (Emp) leads to failure of erythroblast nuclear extrusion. *J. Biol. Chem.* 281, 20181–20189.

Sorkin, A., McKinsey, T., Shih, W., Kirchhausen, T., and Carpenter, G. (1995). Stoichiometric interaction of the epidermal growth factor receptor with the clathrin-associated protein complex AP-2. *J. Biol. Chem.* 270, 619–625.

Spinelli, E., Caporale, R., Buchi, F., Masala, E., Gozzini, A., Sanna, A., Sassolini, F., Valencia, A., Bosi, A., and Santini, V. (2012). Distinct signal transduction abnormalities and erythropoietin response in bone marrow hematopoietic cell subpopulations of myelodysplastic syndrome patients. *Clin. Cancer Res.* 18, 3079–3089.

Sun, J., Pedersen, M., Bengtsson, S., and Rönstrand, L. (2007). Grb2 mediates negative regulation of stem cell factor receptor/c-Kit signaling by recruitment of Cbl. *Exp. Cell Res.* 313, 3935–3942.

-T-

Takagi, M., Absalon, M.J., McLure, K.G., and Kastan, M.B. (2005). Regulation of p53 translation and induction after DNA damage by ribosomal protein L26 and nucleolin. *Cell* 123, 49–63.

Tamborini, E., Bonadiman, L., Greco, A., Albertini, V., Negri, T., Gronchi, A., Bertulli, R., Colecchia, M., Casali, P.G., Pierotti, M.A., et al. (2004). A new mutation in the KIT ATP pocket causes acquired resistance to imatinib in a gastrointestinal stromal tumor patient. *Gastroenterology* 127, 294–299.

Tamborini, E., Pricl, S., Negri, T., Lagonigro, M.S., Miselli, F., Greco, A., Gronchi, A., Casali, P.G., Ferrone, M., Fermeiglia, M., et al. (2006). Functional analyses and molecular modeling of two c-Kit mutations responsible for imatinib secondary resistance in GIST patients. *Oncogene* 25, 6140–6146.

Tan, B.L., Hong, L., Munugalavadla, V., and Kapur, R. (2003). Functional and biochemical consequences of abrogating the activation of multiple diverse early signaling pathways in Kit. Role for Src kinase pathway in Kit-induced cooperation with erythropoietin receptor. *J. Biol. Chem.* 278, 11686–11695.

Tauchi, T., Damen, J.E., Toyama, K., Feng, G.S., Broxmeyer, H.E., and Krystal, G. (1996). Tyrosine 425 within the activated erythropoietin receptor binds Syp, reduces the erythropoietin required for Syp tyrosine phosphorylation, and promotes mitogenesis. *Blood* 87, 4495–4501.

Théou-Anton, N., Tabone, S., Brouty-Boyé, D., Saffroy, R., Ronnstrand, L., Lemoine, A., and Emile, J.-F. (2006). Co expression of SCF and KIT in gastrointestinal stromal tumours (GISTs) suggests an autocrine/paracrine mechanism. *Br. J. Cancer* *94*, 1180–1185.

Thiry, M., Cheutin, T., O'Donohue, M.F., Kaplan, H., and Ploton, D. (2000). Dynamics and three-dimensional localization of ribosomal RNA within the nucleolus. *RNA* *6*, 1750–1761.

Tong, W., Zhang, J., and Lodish, H.F. (2005). Lnk inhibits erythropoiesis and Epo-dependent JAK2 activation and downstream signaling pathways. *Blood* *105*, 4604–4612.

Topisirovic, I., Guzman, M.L., McConnell, M.J., Licht, J.D., Culjkovic, B., Neering, S.J., Jordan, C.T., and Borden, K.L.B. (2003). Aberrant eukaryotic translation initiation factor 4E-dependent mRNA transport impedes hematopoietic differentiation and contributes to leukemogenesis. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 8992–9002.

Torihashi, S., Ward, S.M., Nishikawa, S., Nishi, K., Kobayashi, S., and Sanders, K.M. (1995). c-kit-dependent development of interstitial cells and electrical activity in the murine gastrointestinal tract. *Cell Tissue Res.* *280*, 97–111.

Turner, A.M., Bennett, L.G., Lin, N.L., Wypych, J., Bartley, T.D., Hunt, R.W., Atkins, H.L., Langley, K.E., Parker, V., and Martin, F. (1995). Identification and characterization of a soluble c-kit receptor produced by human hematopoietic cell lines. *Blood* *85*, 2052–2058.

-U-

Ullrich, A., and Schlessinger, J. (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* *61*, 203–212.

Uoshima, N., Ozawa, M., Kimura, S., Tanaka, K., Wada, K., Kobayashi, Y., and Kondo, M. (1995). Changes in c-Kit expression and effects of SCF during differentiation of human erythroid progenitor cells. *Br. J. Haematol.* *91*, 30–36.

-V-

Valent, P. (2008). Systemic mastocytosis. *Cancer Treat. Res.* *142*, 399–419.

Valent, P., Akin, C., Arock, M., Brockow, K., Butterfield, J.H., Carter, M.C., Castells, M., Escribano, L., Hartmann, K., Lieberman, P., et al. (2012). Definitions, criteria and global classification of mast cell disorders with special reference to mast cell activation syndromes: a consensus proposal. *Int. Arch. Allergy Immunol.* *157*, 215–225.

Vardiman, J.W., Harris, N.L., and Brunning, R.D. (2002). The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* *100*, 2292–2302.

Vardiman, J.W., Thiele, J., Arber, D.A., Brunning, R.D., Borowitz, M.J., Porwit, A., Harris, N.L., Le Beau, M.M., Hellström-Lindberg, E., Tefferi, A., et al. (2009). The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* *114*, 937–951.

Velazquez, L., Cheng, A.M., Fleming, H.E., Furlonger, C., Vesely, S., Bernstein, A., Paige, C.J., and Pawson, T. (2002). Cytokine signaling and hematopoietic homeostasis are disrupted in *Lnk*-deficient mice. *J. Exp. Med.* **195**, 1599–1611.

Vlachos, A., Ball, S., Dahl, N., Alter, B.P., Sheth, S., Ramenghi, U., Meerpohl, J., Karlsson, S., Liu, J.M., Leblanc, T., et al. (2008). Diagnosing and treating Diamond Blackfan anaemia: results of an international clinical consensus conference. *Br. J. Haematol.* **142**, 859–876.

Voisset, E., Lopez, S., Dubreuil, P., and De Sepulveda, P. (2007). The tyrosine kinase FES is an essential effector of KITD816V proliferation signal. *Blood* **110**, 2593–2599.

Voisset, E., Lopez, S., Chaix, A., Vita, M., George, C., Dubreuil, P., and De Sepulveda, P. (2010). FES kinase participates in KIT-ligand induced chemotaxis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **393**, 174–178.

Voit, R., Kuhn, A., Sander, E.E., and Grummt, I. (1995). Activation of mammalian ribosomal gene transcription requires phosphorylation of the nucleolar transcription factor UBF. *Nucleic Acids Res.* **23**, 2593–2599.

-W-

Walrafen, P., Verdier, F., Kadri, Z., Chrétien, S., Lacombe, C., and Mayeux, P. (2005). Both proteasomes and lysosomes degrade the activated erythropoietin receptor. *Blood* **105**, 600–608.

Wandzioch, E., Edling, C.E., Palmer, R.H., Carlsson, L., and Hallberg, B. (2004). Activation of the MAP kinase pathway by c-Kit is PI-3 kinase dependent in hematopoietic progenitor/stem cell lines. *Blood* **104**, 51–57.

Wang, L., Zhang, Z., Wang, Y., Zhang, R., and Chopp, M. (2004). Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats. *Stroke* **35**, 1732–1737.

Ward, S.M., Burns, A.J., Torihashi, S., and Sanders, K.M. (1994). Mutation of the proto-oncogene c-kit blocks development of interstitial cells and electrical rhythmicity in murine intestine. *J. Physiol. (Lond.)* **480** (Pt 1), 91–97.

Wasag, B., Chmara, M., and Legius, E. (2012). Molecular characterization of two novel KIT mutations in patients with piebaldism. *J. Dermatol. Sci.* **66**, 78–79.

Waskow, C., Terszowski, G., Costa, C., Gassmann, M., and Rodewald, H.-R. (2004). Rescue of lethal c-Kit^{W/W} mice by erythropoietin. *Blood* **104**, 1688–1695.

Watowich, S.S., Hilton, D.J., and Lodish, H.F. (1994). Activation and inhibition of erythropoietin receptor function: role of receptor dimerization. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 3535–3549.

Waugh, R.E., Mantalaris, A., Bauserman, R.G., Hwang, W.C., and Wu, J.H. (2001). Membrane instability in late-stage erythropoiesis. *Blood* **97**, 1869–1875.

Wehrle-Haller, B. (2003). The role of Kit-ligand in melanocyte development and epidermal homeostasis. *Pigment Cell Res.* 16, 287–296.

Weiler, S.R., Mou, S., DeBerry, C.S., Keller, J.R., Ruscetti, F.W., Ferris, D.K., Longo, D.L., and Linnekin, D. (1996). JAK2 is associated with the c-kit proto-oncogene product and is phosphorylated in response to stem cell factor. *Blood* 87, 3688–3693.

Westenfelder, C., Biddle, D.L., and Baranowski, R.L. (1999). Human, rat, and mouse kidney cells express functional erythropoietin receptors. *Kidney Int.* 55, 808–820.

Wickrema, A., Krantz, S.B., Winkelmann, J.C., and Bondurant, M.C. (1992). Differentiation and erythropoietin receptor gene expression in human erythroid progenitor cells. *Blood* 80, 1940–1949.

Williams, D.E., Eisenman, J., Baird, A., Rauch, C., Van Ness, K., March, C.J., Park, L.S., Martin, U., Mochizuki, D.Y., and Boswell, H.S. (1990). Identification of a ligand for the c-kit proto-oncogene. *Cell* 63, 167–174.

Wisniewski, D., Strife, A., and Clarkson, B. (1996). c-kit ligand stimulates tyrosine phosphorylation of the c-Cbl protein in human hematopoietic cells. *Leukemia* 10, 1436–1442.

Witthuhn, B.A., Quelle, F.W., Silvennoinen, O., Yi, T., Tang, B., Miura, O., and Ihle, J.N. (1993). JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell* 74, 227–236.

Wollberg, P., Lennartsson, J., Gottfridsson, E., Yoshimura, A., and Rönstrand, L. (2003). The adapter protein APS associates with the multifunctional docking sites Tyr-568 and Tyr-936 in c-Kit. *Biochem. J.* 370, 1033–1038.

Wu, H., Liu, X., Jaenisch, R., and Lodish, H.F. (1995a). Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell* 83, 59–67.

Wu, H., Klingmüller, U., Besmer, P., and Lodish, H.F. (1995b). Interaction of the erythropoietin and stem-cell-factor receptors. *Nature* 377, 242–246.

Wu, H., Klingmüller, U., Acurio, A., Hsiao, J.G., and Lodish, H.F. (1997). Functional interaction of erythropoietin and stem cell factor receptors is essential for erythroid colony formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 1806–1810.

-X-

Xiong, X., Zhao, Y., He, H., and Sun, Y. (2011). Ribosomal protein S27-like and S27 interplay with p53-MDM2 axis as a target, a substrate and a regulator. *Oncogene* 30, 1798–1811.

-Y-

Yadavilli, S., Mayo, L.D., Higgins, M., Lain, S., Hegde, V., and Deutsch, W.A. (2009). Ribosomal protein S3: A multi-functional protein that interacts with both p53 and MDM2 through its KH domain. *DNA Repair (Amst.)* 8, 1215–1224.

Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L.H., Thompson, C.B., and Korsmeyer, S.J. (1995). Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 80, 285–291.

Yang, Y., Li, C.-C.H., and Weissman, A.M. (2004). Regulating the p53 system through ubiquitination. *Oncogene* 23, 2096–2106.

Yarden, Y., Kuang, W.J., Yang-Feng, T., Coussens, L., Munemitsu, S., Dull, T.J., Chen, E., Schlessinger, J., Francke, U., and Ullrich, A. (1987). Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J.* 6, 3341–3351.

Yasuda, Y., Masuda, S., Chikuma, M., Inoue, K., Nagao, M., and Sasaki, R. (1998). Estrogen-dependent production of erythropoietin in uterus and its implication in uterine angiogenesis. *J. Biol. Chem.* 273, 25381–25387.

Yoshimura, A., Longmore, G., and Lodish, H.F. (1990). Point mutation in the exoplasmic domain of the erythropoietin receptor resulting in hormone-independent activation and tumorigenicity. *Nature* 348, 647–649.

Yuzawa, S., Opatowsky, Y., Zhang, Z., Mandiyan, V., Lax, I., and Schlessinger, J. (2007). Structural basis for activation of the receptor tyrosine kinase KIT by stem cell factor. *Cell* 130, 323–334.

-Z-

Zanjani, E.D., Poster, J., Burlington, H., Mann, L.I., and Wasserman, L.R. (1977). Liver as the primary site of erythropoietin formation in the fetus. *J. Lab. Clin. Med.* 89, 640–644.

Zermati, Y., Garrido, C., Amsellem, S., Fishelson, S., Bouscary, D., Valensi, F., Varet, B., Solary, E., and Hermine, O. (2001). Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *J. Exp. Med.* 193, 247–254.

Zetterberg, A., Larsson, O., and Wiman, K.G. (1995). What is the restriction point? *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 835–842.

Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J., and Korsmeyer, S.J. (1996). Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 87, 619–628.

Zhang, Y., Wolf, G.W., Bhat, K., Jin, A., Allio, T., Burkhart, W.A., and Xiong, Y. (2003). Ribosomal protein L11 negatively regulates oncoprotein MDM2 and mediates a p53-dependent ribosomal-stress checkpoint pathway. *Mol. Cell. Biol.* 23, 8902–8912.

Zhang, Z., Zhang, R., Joachimiak, A., Schlessinger, J., and Kong, X.P. (2000). Crystal structure of human stem cell factor: implication for stem cell factor receptor dimerization and activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 7732–7737.

Zharskaia, O.O., and Zatsepina, O.V. (2005). [Assembly of nucleolus-derived foci in various cultured mammalian cells during mitosis]. *Tsitologiya* 47, 780–788.

Zhu, W.M., Dong, W.F., and Minden, M. (1994). Alternate splicing creates two forms of the human kit protein. *Leuk. Lymphoma* 12, 441–447.

Zsebo, K.M., Williams, D.A., Geissler, E.N., Broudy, V.C., Martin, F.H., Atkins, H.L., Hsu, R.Y., Birkett, N.C., Okino, K.H., and Murdock, D.C. (1990). Stem cell factor is encoded at the Sl locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor. *Cell* 63, 213–224.

Annexe I

Phosphorylation des tyrosines 703 et 936 de c-Kit,
en absence de SCF et en réponse à l'EPO

Protein names	Gene names	Amino acid	Phospho (STY) Probabilities	Ratio H/L	Position
AFG3-like protein 2	AFG3L2	Y	QYQDLGAKIPK	0,50427	348
Alpha-enolase	ENO	Y	AAVPSGASTGIYEALER	0,875	44
Amyloid-like protein 2	APLP2	Y	MONHGYENPTYK	0,52542	755
Amyloid-like protein 2	APLP2	Y	MONHGYENPTYK	0,53448	750
Catenin delta-1	CTNND1	Y	LNGPODHSLLYSTIPR	0,90145	96
Cyclin-dependent kinase 1	CDK1	Y	IEKIGEGTYGVVYK	0,99929	15
Cyclin-dependent kinase 1	CDK1	Y	IGEGTYGVVYKGR	1,0044	19
Cyclin-dependent kinase 3	CDK2	Y	IGEGTYGVVYK	1,0209	15
Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A	DYRK1A	Y	IYQYQSR	1,0657	321
Elongation factor 1-alpha 1	EEF1A1	Y	STTTGHLIYK	1,0051	29
Heat shock 70 kDa protein 4	HSPA4	Y	LKKEDIYAVEIVGGATR	2,1552	336
Homeodomain-interacting protein kinase 1	HIPK1	Y	AVCSTYLQSR	1,0374	352
Homeodomain-interacting protein kinase 3	HIPK3	Y	TVCSSTYLQSR	1,117	359
Junctional adhesion molecule A	F11R	Y	VIYSQPSAR	0,80503	284
Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor II-c	FCGR2C	Y	APTDDDKNIYLTLPNDHVNNSNN	0,91109	310
Low-density lipoprotein receptor	LDLR	Y	NINSINFONPVYQK	0,63294	828
Lysosomal-associated transmembrane protein 4A	LAPTM4A	Y	MPEKEPPPYLPA	0,48625	230
Mast/stem cell growth factor receptor Kit	KIT	Y	OISESTNHIYNSLANCSPNR	0,81636	936
Mast/stem cell growth factor receptor Kit	KIT	Y	OEDHAEALYK	0,96584	703
Mitogen-activated protein kinase 1	MAPK1	Y	VADPDHDHTGFLTEYVATR	1,215	187
Mitogen-activated protein kinase 14	MAPK14	Y	HTDDEMTGYVATR	0,95259	182
Mitogen-activated protein kinase 3	MAPK3	Y	IADPEHDHTGFLTEYVATR	1,1194	204
Mucin-1;Mucin-1 subunit alpha	MUC1	Y	VVPPSSTRSPYEK	0,87778	1238
Non-receptor tyrosine-protein kinase TYK2	TYK2	Y	LLAQAEGEPCYIR	0,87173	292
Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase 1	INPP5D	Y	EKLYDFVK	0,72135	865
Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase 2	INPPL1	Y	NSFNNPAYVVLEGVPHOLLPEPPSPAR	0,61603	986
Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase 2	INPPL1	Y	NSFNNPAYVVLEGVPHOLLPEPPSPAR	0,61603	987
Pituitary tumor-transforming gene 1 protein-interacting protein	PTTG1IP	Y	YGLFKEENPYAR	0,87243	174
Protein CDV3 homolog	CDV3	Y	KTPQGPPPEISDTQFPSLQSTAK	0,47767	190
Receptor-type tyrosine-protein phosphatase alpha	PTPRA	Y	VVOEYDAFSDYANFK	0,98141	809
Serine/threonine-protein kinase PRP4 homolog	PRPF4B	Y	LCDFGSASHVADNDITPYLVSR	0,93596	849
SHC-transforming protein 1	SHC1	Y	ELFDPPSYVNVONLDK	0,66481	428
Signal transducer and activator of transcription 5	STAT5	Y	AVDGYVKQIJK	0,53393	694
Sodium- and chloride-dependent creatine transporter 1	SLC6A8	Y	SAENGIVSVSGDEK	0,97298	11
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	ATP1A1	Y	GIVVYTGDR	1,0695	260
Sodium-coupled neutral amino acid transporter 2	SLC38A2	Y	SHYADVDPENONFLLESNLGKK	0,29259	41
Tight junction protein ZO-2	TJP2	Y	IEIAQKHPDIYAVPIK	0,29144	1149
Transferrin receptor protein 1	TFRC	Y	SAFSNLFGGEPLSYTR	0,68171	20
Transgelin-2	TAGLN2	Y	ANRGPAYGLSR	0,98633	8
Tyrosine-protein kinase JAK2	JAK2;JAK2	Y	EVGDYGQLHETEVLLK	1,0127	570
Tyrosine-protein kinase Lyn	LYN	Y	SLDNGGYISPR	0,87172	193
Tyrosine-protein kinase Lyn	LYN	Y	SLDNGGYISPR	0,90275	194
Tyrosine-protein kinase Lyn	LYN	Y	VIEDNEYTAREGAK	1,0682	397
Tyrosine-protein kinase SYK	SYK	Y	QESTVSFNPYEPELAPWAADKGPQR	0,91973	323
Tyrosine-protein kinase Yes;	YES1	Y	LIEDNEYTAR	1,4417	426
Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11	PTPN11	Y	IONTGDYDLYGGKEK	0,9503	63
Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11	PTPN11	Y	IONTGDYDLYGGKEK	0,95104	62
Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 18	PTPN18;PTPN18	Y	SAEEAPLYSK	0,87185	389
U1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kDa	SNRNP70	Y	EFEVYGPIKR	0,88189	126

Annexe II

Article publié

Epigenetic control of NFκB dependent FAS gene transcription during progression of myelodysplastic syndromes.

Ettou S, Humbrecht C, Benet B, Billot K, **d'Allard D**, Mariot V, Goodhardt M, Kosmider O, Mayeux P, Solary E, Fontenay M.

MCR, 2013, 10.1158/1541-7786

Epigenetic Control of NF- κ B-Dependent *FAS* Gene Transcription during Progression of Myelodysplastic Syndromes

Sandrine Ettou^{1,2,3,4}, Catherine Humbrecht^{1,2,3,4}, Blandine Benet^{1,2,3,4,5}, Katy Billot^{1,2,3,4}, Diane d'Allard^{1,2,3,4}, Virginie Mariot^{1,2,3,4}, Michele Goodhardt⁵, Olivier Kosmider^{1,2,3,4,6}, Patrick Mayeux^{1,2,3,4}, Eric Solary^{7,8}, and Michaela Fontenay^{1,2,3,4,6}

Abstract

The death domain containing TNF receptor 6 (CD95/Fas) is a direct target for the NF- κ B transcription factor and is repressed in solid tumors such as colon carcinomas. Previously, we reported that the Fas death receptor, while overexpressed in low-risk myelodysplastic syndromes (MDS), becomes undetectable on CD34⁺ progenitors when the disease progresses to secondary acute myeloid leukemia (AML). This study determined the interplay between NF- κ B and Fas during MDS progression. We first observed that Fas was induced by TNF- α in the HL60 cell line. In these cells, p65 (RELA) was associated with the *FAS* promoter, and inhibition of the NF- κ B pathway by an IKK α inhibitor (BAY11-7082) or lentiviral expression of a nondegradable mutant of I κ B α (I κ SR) blocked Fas expression. In contrast, TNF- α failed to induce Fas expression in the colon carcinoma cell line SW480, due to hypermethylation of the *FAS* promoter. Azacitidine rescued p65 binding on *FAS* promoter *in vitro*, and subsequently Fas expression in SW480 cells. Furthermore, inhibition of the NF- κ B pathway decreased the expression of Fas in MDS CD45^{lo}CD34⁺ bone marrow cells. However, despite the nuclear expression of p65, Fas was often low on CD45^{lo}CD34⁺ AML cells. TNF- α failed to stimulate its expression, while azacitidine efficiently rescued p65 binding and Fas reexpression. Overall, these data suggest that DNA methylation at NF- κ B sites is responsible for *FAS* gene silencing. *Mol Cancer Res*; 11(7): 1–12. ©2013 AACR.

Introduction

CD95/Fas/APO-1/TNFRSF6 is a member of the death receptor family. Binding of its ligand FasL triggers the receptor trimerization and apoptosis signaling (1). This function is critical for the maintenance of hematopoietic cell homeostasis, in particular of the lymphocytic and erythroid lineages (2, 3). In pathologic conditions, suppression of Fas signaling leads to autoimmune diseases (4) and contributes to tumorigenesis by inducing a resistance to FasL-dependent apoptosis (5). In established tumors with repressed Fas, restoration of Fas activity by transfection suppresses tumor growth and

rescues apoptosis and chemosensitivity (5). Fas expression, which is regulated by TNF- α or IFN- γ in many cell systems including normal hematopoietic cells, is critically dependent on NF- κ B activation (6, 7).

The transcription factor NF- κ B, which functions as a homo or heterodimer composed of proteins p65 or p50, regulates a variety of cellular pathways that include inflammatory response, angiogenesis, proliferation, and survival (8). In resting cells, NF- κ B is sequestered in the cytoplasm by an inhibitory I κ B protein, predominantly I κ B α (8). The canonical NF- κ B pathway, which is typically activated upon TNF- α stimulation, involves the inhibitor of I κ B kinase (IKK), leading to the proteasomal degradation of I κ B α and the translocation of NF- κ B to the nucleus (8–10). The constitutive activation of NF- κ B pathway identified in solid tumors (11) and in diverse hematologic malignancies (12–16) has been suggested to promote cell survival through the transcription of apoptosis inhibitors such as *BCL2L1* encoding BclXL or *XIAP*. However, NF- κ B could also promote apoptosis in a cell type- and stimulus-dependent manner (17, 18), for example, through direct induction of *FAS* gene transcription in lymphocytes and liver cells (19, 20).

The transformation of myelodysplastic syndromes (MDS) to acute myelogenous leukemia (AML) is accompanied by the acquisition of mechanisms of resistance to apoptosis, either the upregulation of antiapoptotic proteins such as Bcl2 or the downregulation of proapoptotic effectors such as Bad

Authors' Affiliations: ¹Département d'Immunologie-Hématologie, Institut Cochin; ²Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U1016; ³Centre National de la Recherche Scientifique, Unité mixte de recherche 8104; ⁴Université Paris Descartes, Faculté de médecine; ⁵Institut Universitaire d'Hématologie, UMRS 940, Hôpital Saint Louis; ⁶Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpitaux Universitaires Paris Centre, Service d'Hématologie Biologique; ⁷Université Paris XI, Faculté de Médecine, Paris; and ⁸Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) 1009, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

Note: Supplementary data for this article are available at Molecular Cancer Research Online (<http://mcr.aacrjournals.org/>).

Corresponding Author: Michaela Fontenay, Service d'Hématologie Biologique, Hôpital Cochin, 27, rue du Faubourg Saint-Jacques, F75679 Paris 14, France. Phone: 33-158412005; Fax: 33-158411995; E-mail: michaela.fontenay@inserm.fr

doi: 10.1158/1541-7786.MCR-12-0607

©2013 American Association for Cancer Research.

(21, 22). Although the forced expression of Bcl2 prevents MDS progenitor apoptosis *in vitro* (23), it has been recently shown using the MDS-like *NUP98-HOXD13* transgenic mice model that Bcl2 does not stimulate the leukemic transformation (24). We have previously reported that Fas receptor was overexpressed at the cell surface of MDS CD34⁺ progenitors in early diseases, whereas it was downregulated at the time of progression (25). Furthermore, we also reported that *FAS* gene silencing in 60% of patients with secondary AML (sAML) was linked to the epigenetic repression of its transcription (26). The aim of the present work was to further investigate the interplay between *FAS* gene and NF- κ B during the progression of MDS to AML.

Materials and Methods

Cell lines, reagents, and antibodies

HL60 and SW480 human cell lines were cultured in RPMI supplemented with glutamine, 10% fetal calf serum, penicillin–streptomycin (GibcoBRL Life Technologies). TNF- α was purchased from R&D Biosystem, BAY11-7082 and azacitidine were from Sigma-Aldrich. The antibodies used were as follows: CD45-PC5, CD34-PE, and CD95-FITC or isotypic IgG1-PC5, IgG1-PE, and IgG1-FITC (Beckman Coulter), p65/RelA rabbit polyclonal antibody (sc-372; Santa Cruz Biotechnology Inc.), and mouse monoclonal actin antibody (A5441; Sigma-Genosys), anti-rabbit and anti-mouse horseradish peroxidase –conjugated secondary antibodies (Cell Signaling Technology).

Bone marrow mononuclear or CD34⁺ cell isolation and culture

Forty-three patients with MDS, that is, 5q–syndrome ($n = 1$), refractory anemia (RA; $n = 6$), refractory cytopenia with multilineage dysplasia (RCMD; $n = 4$), RA or RCMD with ring sideroblasts (RARS or RCMD-RS; $n = 9$), RA with excess of blasts type I (RAEB1; $n = 11$), or type II (RAEB2; $n = 12$), or sAML ($n = 10$) and 15 age-matched controls with normal bone marrow were included between 2005 and 2011 after they gave their informed consent (Supplementary Table S1). This study was approved by the local ethics committee. CD34⁺ cells were sorted from mononuclear cell populations on magnetic beads (kit MACS; Miltenyi Biotech). Purity was controlled by flow cytometry and was always more than 85%. Mononuclear cells isolated on Ficoll gradient were maintained in Iscove's modified Dulbecco's medium (GibcoBRL Life Technologies) containing 10% fetal calf serum or 15% bovine serum albumin with insulin and transferrin, 50 ng/mL stem cell factor (SCF), 50 ng/mL thrombopoietin (TPO), 100 ng/mL Flt3-ligand (FLT3L) and 20 ng/mL interleukin-6 (IL-6). In some experiments, cells were incubated with 10 ng/mL of TNF- α .

Flow cytometry

Membrane Fas expression was quantified by flow cytometry on cell lines or bone marrow CD45^{lo}/CD34⁺ cell population after red blood cell lysis and expressed as ratio of

median fluorescence intensity (RFI) between specific to isotypic antibody. Analysis was conducted on FC500 flow cytometer (Beckman Coulter) using CXP Analysis software (Beckman Coulter).

Gene expression analysis

RNA from bone marrow mononuclear cell stored in Trizol (Invitrogen) or from cell lines was extracted on RNeasy Plus Mini kit (Qiagen). The quality was assessed by size fractionation by microfluidics instrument (Agilent Technologies). One microgram RNA was used per reverse transcription reaction using the Superscript2 (Invitrogen). cDNA strand was diluted and conserved at -80°C . Quantitative PCR (qPCR) was conducted with a LightCycler FastStart DNA Master PLUS SYBR Green I kit on LightCycler (Roche Diagnostics). According to Minimum Information for Publication of Quantitative real-time PCR Experiments (MIQE) guidelines, a standard curve and an internal calibrator were prepared from U937 RNA. Each sample was tested twice for the expression of the transcripts and also for the expression of the reference genes *GAPDH* and *B2M*. The specific fluorescence threshold was the quantification cycle (C_q) value. Relative quantities (RQ) of *FAS/TNFRSF6* or *BCL2L1* were determined in patient or control samples compared with the calibrator U937 [$\text{RQ} = \Delta C_q \text{ FAS/TNFRSF6 or BCL2L1 (sample - calibrator)}$] and normalized to reference genes as normalized relative quantity [$\text{NRQ} = \text{RQ}_{\text{FAS/TNFRSF6 or BCL2L1}} / \text{NF}$ with $\text{NF} = \sqrt{\text{RQ}_{\text{GAPDH}} \times \text{RQ}_{\text{B2M}}}$] according to the ΔC_q method. Primer sequences and validation are summarized in Supplementary Table S2.

Immunofluorescence

Cells were washed in PBS 1 \times pH 7.4 and cytospined. After treatment with acetone, cell fixation was achieved with 2% PBS–formaldehyde for 20 minutes. Then, cells were permeabilized in methanol for 10 minutes at room temperature, followed by 15 minutes at 4°C with PBS–Triton 0.2%. After saturation in PBS containing 3% human serum albumin (HSA) for 1 hour, cells were incubated with p65/RelA rabbit polyclonal antibody at 1:200 in PBS–HSA 1%–Tween 0.1% overnight at 4°C . After washing, cells were incubated with goat anti-rabbit Alexa Fluor 568–conjugated antibody (Molecular Probes, Invitrogen) at 1:5,000 for 40 minutes at room temperature. Nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma) at 1:1,000 for 5 minutes at room temperature. Images were obtained on a Leica DMB microscope and analyzed using Metamorph software (Molecular Devicer Corp.). Signals were quantified using ImageJ software (NIH, Bethesda, MD).

Nuclear extracts and p65/RelA oligoprecipitation

Cells were lysed for 10 minutes at 4°C in buffer A (10 mmol/L HEPES, pH 7.6, 3 mmol/L MgCl_2 , 10 mmol/L KCl, 5% glycerol, and 0.5% NP-40) containing 1 mmol/L Na_2VO_4 , 20 mmol/L NaF, 1 mmol/L sodium pyrophosphate, 25 mmol/L β -glycerophosphate and proteinase inhibitors (Roche Diagnostics). After centrifugation, nuclear

pellets were extracted in buffer A containing 300 mmol/L KCl. For p65/RelA pulldown assays, nuclear extracts (10^7 cells) were precipitated on 2 μ g double-strand biotin-labeled oligonucleotide at 4°C for 1 hour. DNA–protein complexes were then pelleted using streptavidin–agarose beads (Amersham Biosciences). Beads were then washed 3 times with buffer A and suspended in 1 \times Laemmli buffer. Sequences of biotinylated oligonucleotides are in Supplementary Table S3.

Western blot analysis

Samples were subjected to 10% SDS–PAGE and transferred to nitrocellulose membrane. Filters were blocked overnight in 5% skimmed milk TBS pH 7.4 0.05% Tween 20 and incubated with the appropriate antibody. Membranes were washed 3 times in TBS–Tween 20 and incubated for 1 hour with the appropriate peroxidase-conjugated secondary antibody.

Lentivirus construction and cell infection

Plasmid encoding I κ B α super-repressor (IkSR) provided by Dr. F. Porteu (Institut Cochin, Paris, France) was inserted in a TRIP Δ U3-EF1 α defective lentivirus expressing the GFP under an IRES. CD34⁺ cells were infected twice at day 0 and 1 after purification. Fas expression was quantified 3 days later on GFP-positive cells by flow cytometry.

FAS promoter methylation analysis

Sodium bisulfite treatment of genomic DNA was used to convert unmethylated cytosine to uracil by oxidative deamination. Briefly, after treatment with proteinase K, DNA was extracted from cell lines or bone marrow CD34⁺ progenitors using the DNA Extraction Kit BACC2 (GE Healthcare), treated in liquid phase by sodium bisulfite using Methyl Detector (Active Motif), dried, solubilized in RNase-free water, and stored at –80°C until use. CD34⁺ cells embedded in agarose beads were treated with 0.2 mg/mL proteinase K RNA grade (Invitrogen) overnight at 37°C in 10 mmol/L Tris–HCl pH 7.5, 10 mmol/L EDTA, 50 mmol/L NaCl, 0.2% SDS. Bead-coated DNA was denatured by heating and incubated for 4 hours at 37°C in a fresh solution of 2.8 mol/L sodium bisulfite, 0.5 mmol/L hydroquinone, and 0.6 mol/L NaOH, pH 5.8. Beads transferred to a Multiscreen-HV (Millipore) filtration plate were washed 8 times in 10 mmol/L Tris–HCl pH 8.0, 10 mmol/L EDTA, and the reaction was stopped by 0.2 N NaOH. FAS promoter was amplified by PCR using the DNA Polymerase Taq Platinum Kit (Invitrogen). Primer pairs specific for bisulfite-treated genomic DNA are described in Supplementary Table S3. PCR products were purified using the QIAquick PCR Purification Kit. For bone marrow CD34⁺ samples, PCR products were cloned in bacteria using TOPO TA Cloning kit. Plasmid DNA was extracted and sequenced on ABI Prism 3100 apparatus (Applied Biosystems).

Chromatin immunoprecipitation

HL60, SW480 cells, or bone marrow mononuclear cells were cross-linked with 1% formaldehyde for 10 minutes at room temperature, lysed in 50 mmol/L Tris–HCl, pH 8.0

containing 1% SDS, 10 mmol/L EDTA, and sonicated with a Vibracell Sonifier (Biorblock Scientific). Chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments were carried out on solubilized chromatin extracted from 10×10^6 cells and diluted 10-fold in ChIP dilution buffer (#20-153; Millipore). Chromatin was precleared for 1 hour and incubated overnight with 2 μ g antibodies against acetyl histone H3 lysine 9/14 (H3K9/14ac), dimethyl histone H3 lysine 4 (H3K4me2), trimethyl histone H3 lysine 27 (H3K27me3) from Millipore, or dimethyl histone H3 lysine 9 (H3K9me2) from Abcam or 2 μ g p65/RelA antibody or isotypic IgG1-mouse/rabbit (Santa Cruz Biotechnology). Immune complexes were collected on salmon sperm DNA/protein A agarose beads and washed. Modified histone/DNA complexes were eluted with 500 μ L 1% SDS, 0.1 mol/L NaHCO₃. After cross-link reversal, DNA was purified by phenol extraction. An aliquot of the sonicated chromatin was treated identically for use as input. qPCR for FAS, NFKB1A, and B2M (Supplementary Table S3) was conducted with the following thermal cycling program: 5 minutes at 95°C, 40 cycles of 30 seconds at 95°C, 30 seconds at 60°C, and 45 seconds at 72°C, followed by a 5-minute extension time at 72°C. Relative enrichment of specific gene segment in ChIP was normalized to DNA input and control immunoglobulin G (IgG) and expressed as followed: $2^{(Cq \text{ input} - Cq \text{ gene})} / 2^{(Cq \text{ input} - Cq \text{ IgG})}$.

Luciferase assay for *in vitro* measurement of FAS promoter activity

Reporter construction pGL2 FAS-Luc containing the –1,519 to +201 FAS promoter region spanning over the transcription start site (TSS; +1) was a gift from Dr. L.B. Owen-Schaub (MD Anderson Cancer Center, Houston, TX; ref. 19). Methylated plasmids were obtained by incubation of 5 μ g of pGL2 FAS-Luc or empty pGL2 with CpG methyltransferase SssI (New England Biolabs) during 4 hours at 37°C. DNA methylation was checked by digestion with the methylation-sensitive restriction endonuclease HpaII. Methylated or unmethylated plasmids were cotransfected in 293T cells (5×10^4) at 300 ng/well with pRL-tk Renilla vector at 10 ng/well to monitor transfection efficiency. At day 2 posttransfection, cells were lysed in Passive Lysis Buffer (Promega) for both firefly and Renilla luciferase activities measurement using the Dual Luciferase Reporter Assay (Promega). Normalized reporter activity is expressed as the firefly luciferase value to the Renilla luciferase value for each experimental condition.

Results

The NF- κ B inhibitor, BAY11-7082, inhibits Fas expression in HL60 cell line

To explore the role of NF- κ B in the regulation of FAS gene expression, we first compared the level of Fas receptor in various tumor cell lines. We chose the myelomonocytic cell line HL60 that expressed Fas, and the colon carcinoma cell line SW480 that did not express the receptor. TNF- α (10 ng/mL) increased the expression of Fas at the surface of

the HL60 cells after 6 hours, whereas it failed to induce Fas on SW480 cells. However, TNF- α (2 hours) stimulated the expression of another NF- κ B target, Bcl χ _L, in these cells

(Fig. 1A). Consistently, TNF- α upregulated the expression of *FAS* transcript in HL60, but not in SW480 cells, and *BCL2L1* that encodes Bcl χ _L was upregulated after 2 hours of

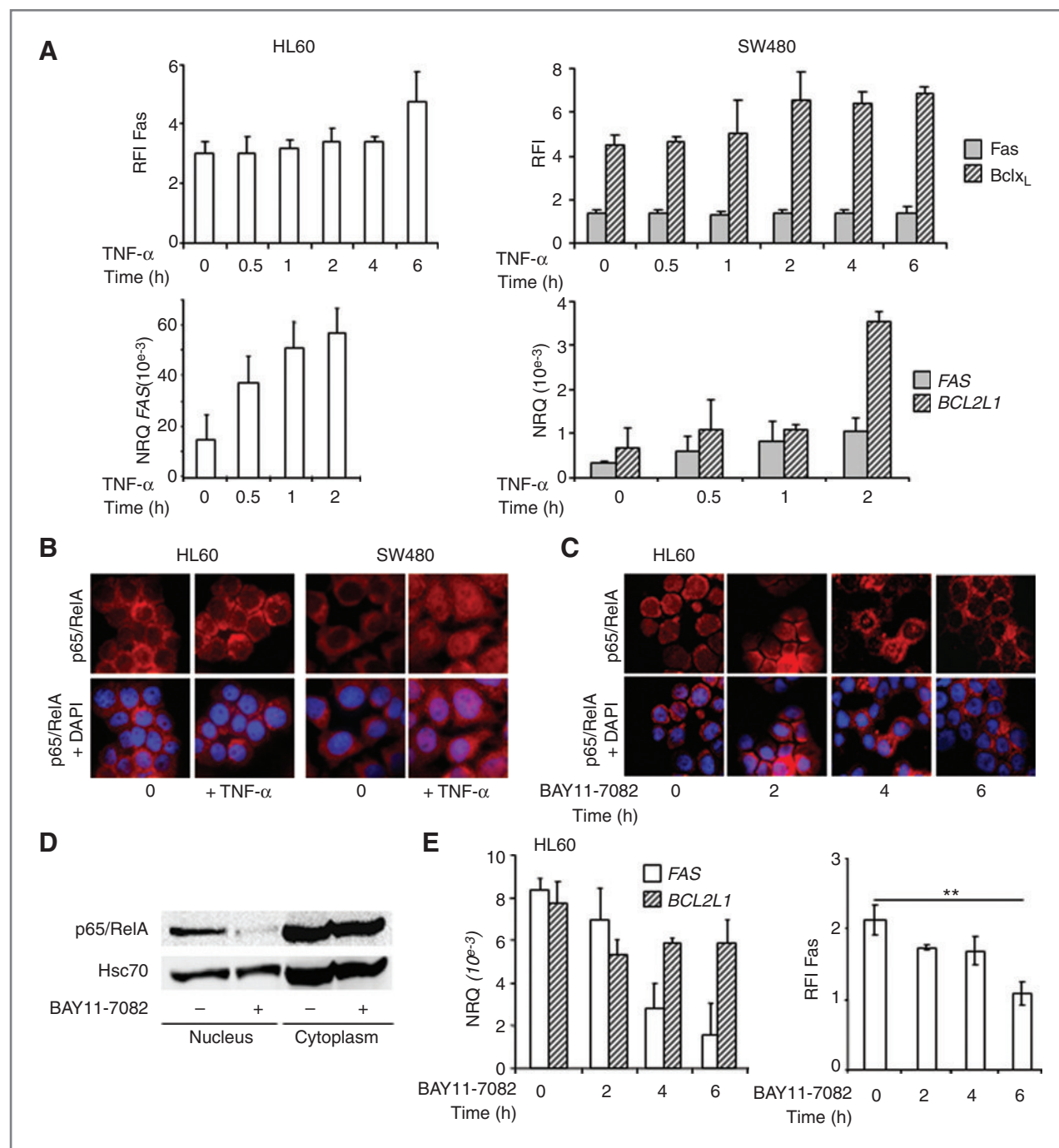


Figure 1. p65/RelA inhibitor, BAY11-7082, inhibits Fas expression in HL60 cell line. **A**, kinetics of Fas expression upon TNF- α (10 ng/mL) stimulation in HL60 cell line (white bars) and kinetics of Fas (gray bars) and Bcl χ _L (hatched bars) in SW480 cell line by flow cytometry or by quantitative real-time PCR (qPCR). Results are expressed as a ratio of median fluorescence intensity (RFI) to isotypic control or NRQs of *FAS* or *BCL2L1* to *GAPDH*, *RNA18S* and *HPRT*, respectively. **B**, immunolocalization of p65/RelA before and after 30 minutes of treatment with 10 ng/mL TNF- α in HL60 and SW480 cell lines. Nuclei were colored with DAPI. **C**, immunolocalization of p65/RelA in HL60 cells untreated (0) or treated with 5 μ M of BAY11-7082 for 2, 4, or 6 hours. Nuclei were colored with DAPI. **D**, one representative of 3 independent experiments. **E**, Western blot analysis for p65/RelA protein in nuclear and cytoplasmic extracts prepared from HL60 cell line, treated or not with 5 μ M of BAY11-7082 for 6 hours. Hsc70 is a loading control. **E**, kinetics of Fas expression upon treatment with 5 μ M of BAY11-7082 in HL60 cell line by qPCR or flow cytometry. Results are expressed as normalized relative quantities (NRQ) using the ΔC_q method or as RFI, respectively. *BCL2L1* gene was used as a positive control.

incubation with TNF- α in SW480 cells (Fig. 1A). p65/RelA subcellular localization was analyzed by immunofluorescence in both cell lines at baseline and after 30 minutes of incubation with 10 ng/mL of TNF- α . In HL60 cells, the p65/RelA protein was detectable in both the nucleus and the cytosol at baseline and after treatment with TNF- α (Fig. 1B). p65/RelA poorly present in the nucleus of SW480 cells, strongly relocalized to the nucleus after a 30-minute treatment with TNF- α and remained in the nucleus until 6 hours (data not shown). These data show that Fas remained unexpressed in SW480 cell line although the NF- κ B pathway was activated as shown by p65/RelA nuclear localization and *BCL2L1* transcription.

We then abrogated NF- κ B canonical signaling pathway by treating the cells with a chemical inhibitor of I κ B α phosphorylation and proteasomal degradation, BAY11-7082. p65/RelA disappeared from the nucleus upon exposure to 5 μ mol/L BAY11-7082 (Fig. 1C). Immunoblot experiments confirmed the diminution of p65/RelA in the nucleus of BAY11-7082-treated cells (Fig. 1D). In the

tested conditions, BAY11-7082-treated HL60 cells were devoid of any sign of apoptosis (not shown), and *FAS* transcript level decreased with time (Fig. 1E, left). BAY11-7082 also reduced, although less efficiently, the expression of *BCL2L1* transcript (Fig. 1E, left) and decreased the expression of Fas at the cell surface (Fig. 1E, right).

p65/RelA binds to *FAS* promoter

The *FAS* gene promoter contains 3 GGGRNYYCC putative NF- κ B sites with R = A/G and Y = T/C in the 5'-untranslated region (5'-UTR) region spreading between -899 and the TSS (+1; Fig. 2A; ref. 19). To determine whether p65/RelA could be recruited at these sites, we carried out *in vitro* DNA affinity precipitation experiments with nuclear extracts prepared from HL60 cells treated with 5 μ mol/L BAY 11-7082 for 6 hours. p65/RelA was precipitated by using 30-bp biotinylated oligonucleotides whose sequence contained either one of the 3 putative NF- κ B-binding sites of the *FAS* promoter, or a consensus tandem NF- κ B-binding site as a positive control, or a

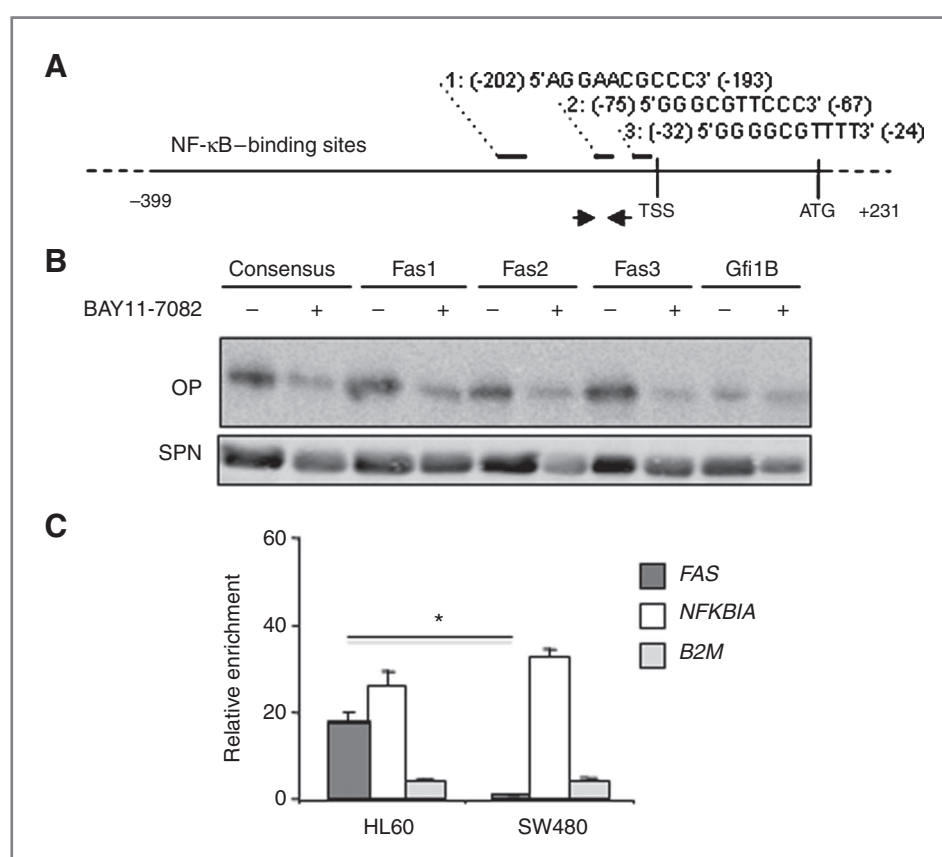


Figure 2. p65/RelA binds to *FAS* promoter. A, schematic representation of 5'-UTR of the *FAS* gene. Putative NF- κ B consensus binding sites are indicated upstream of TSS. Arrows indicate the position of primers for ChIP of p65/RelA. B, *in vitro* DNA-binding affinity precipitation experiment of p65/RelA. HL60 nuclear extracts were incubated with biotinylated-oligonucleotides deriving from each of the putative NF- κ B-binding sites at *FAS* promoter (Fas1, Fas2, and Fas3), or a tandemly repeated consensus sequence for NF- κ B as a positive control, or an oligonucleotide deriving from the promoter of *Gfi1B* gene as a negative control. Oligoprecipitates (OP) were trapped on streptavidin beads and harvested by centrifugation. Oligoprecipitates and the corresponding supernatants (SPN) were analyzed on 2 separated gels by Western blotting using antibodies to p65/RelA. One representative of 3 independent experiments. C, ChIP of p65/RelA at *FAS* gene promoter in SW480 cell line or HL60 cell line treated or not with 10 ng/mL TNF- α for 6 hours. *NFKBIA* and *B2M* gene were amplified as positive and negative controls, respectively. Enrichment of p65/RelA compared with DNA input and control isotypic IgG (means \pm SD of 2 independent experiments).

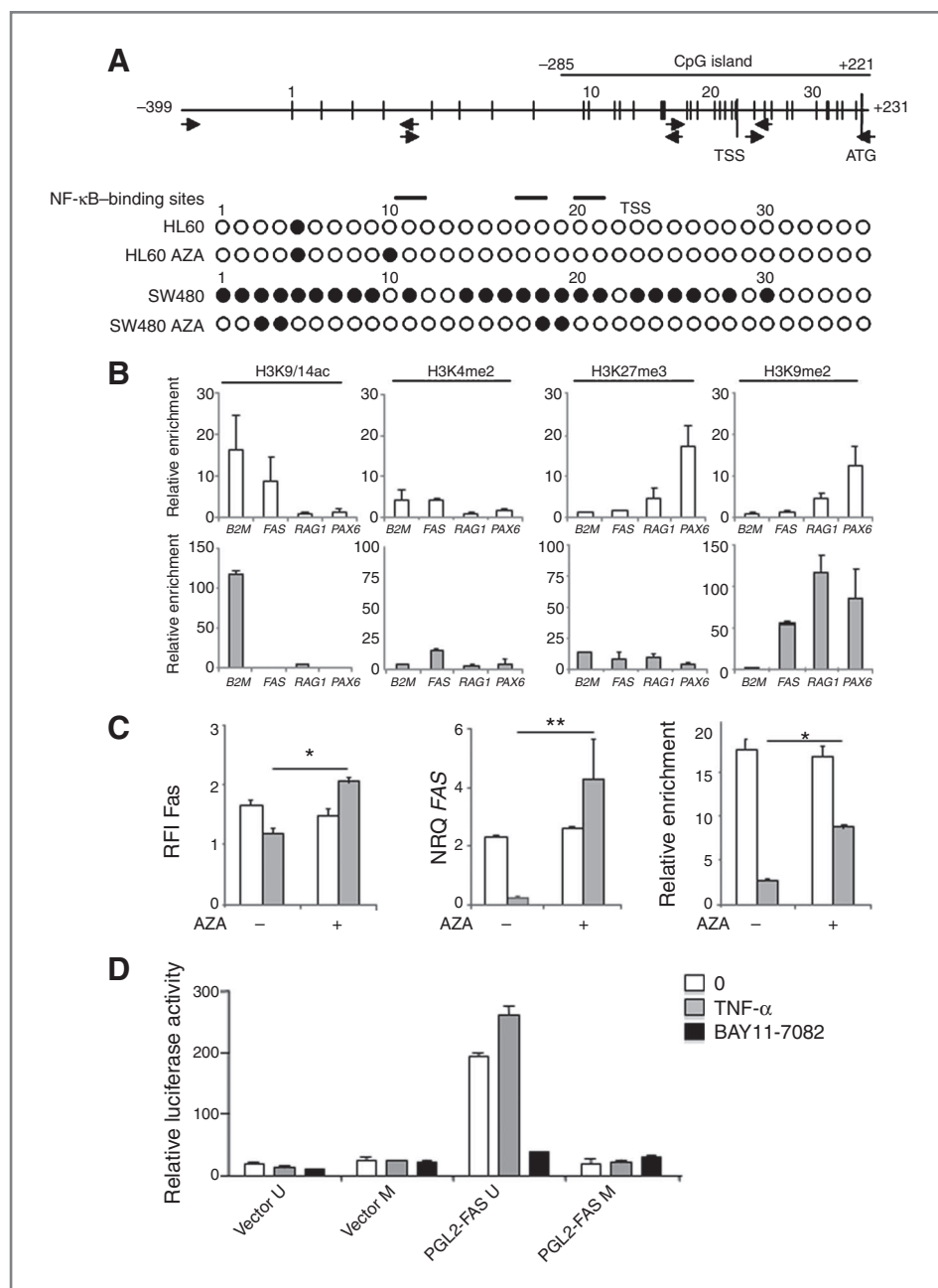
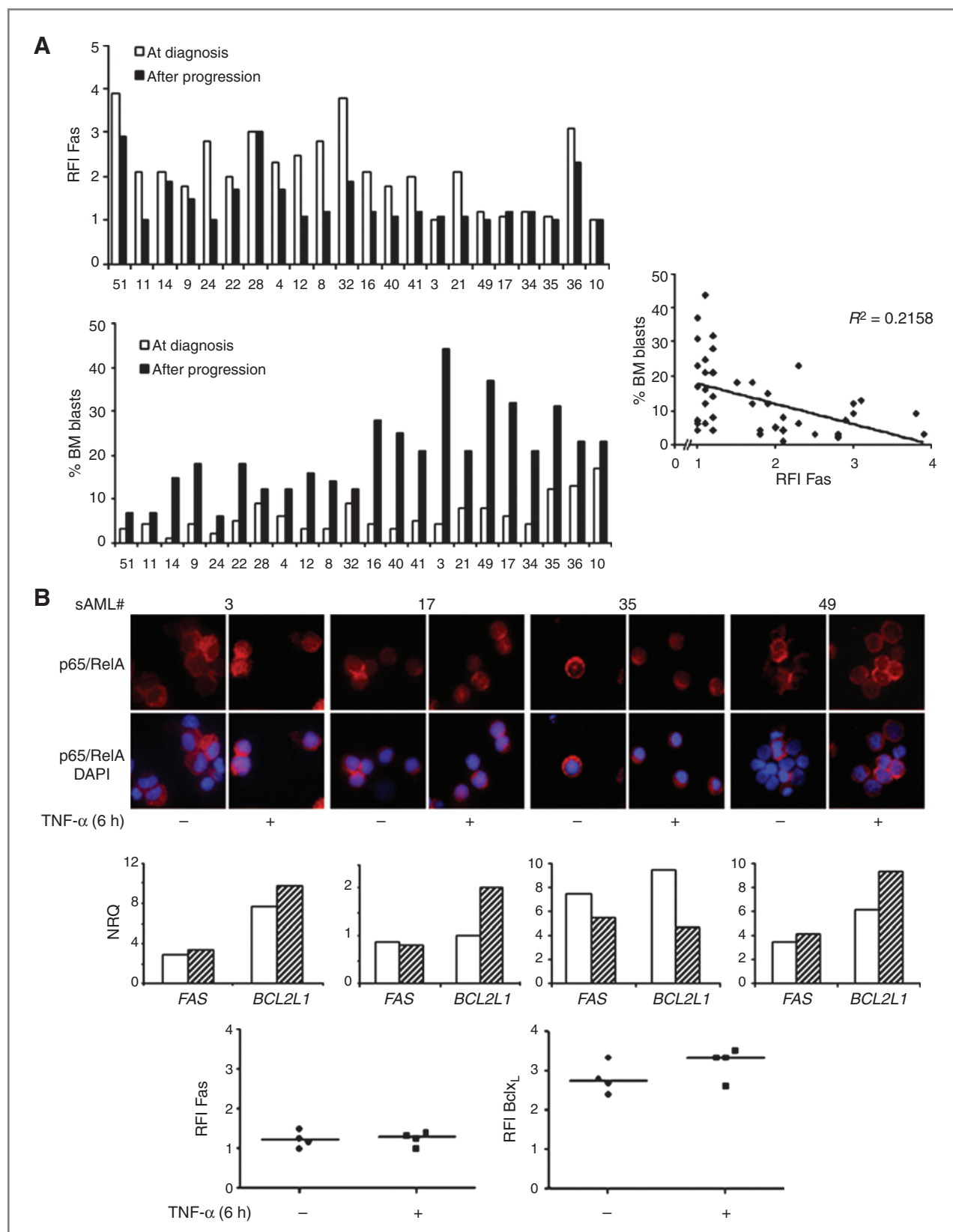


Figure 3. DNA methylation level at FAS promoter regulates the binding of p65/RelA to the chromatin. A, DNA methylation of CpG dinucleotides at FAS gene promoter analyzed on bisulfite-treated genomic DNA by PCR and sequencing. Top, schematic representation of the CpG dinucleotides (vertical lines) and CpG island in the 5' flanking region of FAS gene. Bottom, CpG methylation before and after treatment with 1 μ mol/L azacitidine for 3 days in HL60 and SW480 cell lines. Filled circles, fully methylated CpGs; open circles, unmethylated CpGs. B, ChIP assay of histone marks at FAS, B2M, RAG1, and PAX6 genes in HL60 (white bars) and SW480 (gray bars) cell lines. Enrichment of H3K9/14ac and H3K4me2 active marks or H3K27me3 and H3K9me2 repressive marks to DNA input and control isotypic IgG are means \pm SD of 3 independent experiments. C, effect of azacitidine (1 μ mol/L for 3 days) on Fas expression by flow cytometry as RFI (left), Fas transcript level by quantitative real-time PCR (qPCR) as NRQ to GAPDH (middle), and ChIP for p65/RelA at FAS promoter (right) in HL60 (white bars) and SW480 (gray bars) cell lines. Student *t* test for *P* values (*, *P* < 0.05 and **, *P* < 0.01). D, luciferase assay for *in vitro* measurement of FAS promoter activity. 293T cells cotransfected with methylated or unmethylated Fas plasmids and pRL-TK Renilla vector were treated with 10 ng/mL TNF- α or 5 μ mol/L BAY11-7082 for 6 hours. Normalized reporter activity is expressed as the firefly luciferase value to the Renilla luciferase value for each experimental condition. Mean \pm SD of 3 independent experiments.

consensus *GFI-1B*-binding site as a negative control. As shown in Fig. 2B, p65/RelA bound to each of the 3 putative NF- κ B-binding sites on FAS promoter, which was prevented by BAY11-7082. Using ChIP assays (Fig. 2C), we found that p65/RelA spontaneously bound to the FAS promoter in HL60 cells. p65/RelA was not recruited at the FAS promoter in Fas-negative SW480 cells. As controls, p65/RelA was recruited to *NFKB1A* gene promoter that contains a NF- κ B site, but not to *B2M* promoter that does not have any NF- κ B site, both in HL60 or SW480 cells (Fig. 2C). Thus, p65/RelA binds to the chromatin at FAS promoter in a cell type-dependent manner.

FAS gene expression is epigenetically regulated

To explain why the recruitment of p65/RelA to the chromatin varied depending on the cell type, we hypothesized that a closed conformation of the chromatin in the FAS gene 5'-UTR regulatory regions may prevent the docking of NF- κ B. To address this question, we compared the DNA methylation level at FAS promoter using bisulfite-treated genomic DNA-specific PCR. The promoter region of human FAS gene spanning in the 5'-UTR region comprised between -899 and +231 contains 35 CpG dinucleotides, of which 26 belong to a CpG island (Methyl Primer Express software v1.0, Applied Biosystems; Fig. 3A). Although only



2 of 35 CpG (6%) were methylated in the Fas-positive HL60 cell line, 24 of 35 CpG (68%) located both 5' upstream of and within the CpG island were methylated in the Fas-negative SW480 cells. In addition, ChIP experiments identified one active mark H3K9/14Ac and none of the 2 repressive marks H3K27me3 and H3K9me2 in HL60 cell line, whereas the repressive mark H3K9me2 was expressed in SW480 cell line (Fig. 3B). These results suggested that the chromatin conformation at *FAS* promoter was open in the Fas-positive HL60 cell line and repressed in the Fas-negative SW480 cell line. Treatment for 3 days with 1 μ mol/L azacitidine induced the demethylation of 20 of 24 CpGs in the SW480 cells, whereas it did not influence the CpG methylation in HL60 cells (Fig. 3A). In these conditions, azacitidine did not induce cell apoptosis or necrosis (not shown) but clearly stimulated the expression of Fas in SW480 but not in HL60 cells (Fig. 3C, left and middle). Azacitidine also increased the recruitment of p65/RelA at *FAS* promoter in SW480 cell line, whereas it did not modify p65/RelA binding in the HL60 cell line (Fig. 3C, right). We also transfected 293T cells with a pGL2 construct containing the *FAS* promoter region (−1,519 to +201 over the TSS) in either a methylated or an unmethylated conformation, inserted upstream of the luciferase gene reporter (19). As shown in Fig. 3D, the luciferase activity was increased in cells transfected with the unmethylated *FAS* promoter construct, thus confirming the regulatory role of DNA methylation on *FAS* promoter activity. TNF- α (10 ng/mL for 6 hours) further increased the promoter activity that was abrogated by the NF- κ B inhibitor, BAY11-7082. Altogether, NF- κ B-dependent *FAS* gene expression is epigenetically regulated.

NF- κ B controls Fas expression in MDS/sAML bone marrow mononuclear cells

The clinical relevance of these findings was investigated in primary bone marrow myeloid cells collected from 53 patients with MDS ($n = 43$) or sAML ($n = 10$) and 15 healthy controls. Karyotype was unavailable in 7 patients. According to the International Prognosis Scoring System (IPSS), 27 patients with MDS had a low-risk (LR)-MDS and 11 had a high-risk (HR)-MDS (Supplementary Table S1). In agreement with our previous data (26), the median Fas protein expression expressed on the CD45^{lo}CD34⁺ bone marrow cells lower in sAML compared with MDS ($P < 0.001$; Supplementary Table S1). Serial samples ($n = 22$) at the time of diagnosis and at the time of progression or transformation were studied for the expression of Fas (Fig. 4A). In 16 cases at diagnosis, the level of Fas protein was elevated mostly in patients with percentages of bone marrow blasts lower than 10%. Among those cases, 14 had a

significant reduction of Fas level at the time of disease progression to HR-MDS or sAML, except for cases 14 and 28. The Fas RFI was inversely correlated with the percentage of bone marrow blasts.

We then investigated the effect of TNF- α on Fas expression. Primary bone marrow mononuclear cells isolated from 4 Fas-negative samples of AML were incubated with 10 ng/mL TNF- α for 6 hours. Immunolocalization of p65/RelA was conducted and showed the presence of p65/RelA in the nucleus of blast cells at baseline. After treatment with TNF- α , we observed an increment of the nuclear expression of p65/RelA in 3 cases (#3, 17, and 49), suggesting that NF- κ B pathway could be activated in these cells (Fig. 4B). However, Fas expression remained low after treatment with TNF- α in the 4 cases both at transcript and protein levels, whereas Bclx_L expression increased in the same 3 cases (Fig. 4B). This suggests that TNF- α -stimulated transcription of *FAS* gene could be specifically abrogated in primary AML cells.

BAY11-7082 decreases Fas expression on MDS/AML bone marrow mononuclear cells

To investigate the role of NF- κ B in the regulation of *FAS* gene transcription, we treated bone marrow mononuclear cells from patients with low/int-1 MDS ($n = 11$) or HR-MDS/AML ($n = 10$) with BAY11-7082 for 6 hours. Sixteen samples were positive for Fas before treatment and BAY11-7082 decreased the expression of Fas in 12 of them (Fig. 5A).

We analyzed the subcellular localization of p65/RelA before and after BAY11-7082 treatment in 4 LR-MDS (2 RA, 1 RCMD-RS, and 1, RAEB1) and 2 HR-MDS (1 sAML and 1 RAEB1 with a complex karyotype). Figure 5B shows 2 representative samples. p65/RelA was detected in the nucleus and in the cytoplasm and disappeared from the nucleus upon treatment with BAY11-7082 that also induced a decrease of *FAS* transcript expression in bone marrow cells (see 3 of the tested cases in Fig. 5C, top). In one case (#11), the sample size allowed following the kinetic of *FAS* and *BCL2L1* gene repression (Fig. 5C, bottom). In addition, lentivirus-mediated expression of an IkSR in MDS CD34⁺ progenitors ($n = 3$) retained p65/RelA in the cytoplasm, which was associated with a decreased expression of Fas at the cell surface (Fig. 5D). This suggests that NF- κ B may participate to the regulation of the transcription of *FAS* gene in primary bone marrow samples from MDS or AML.

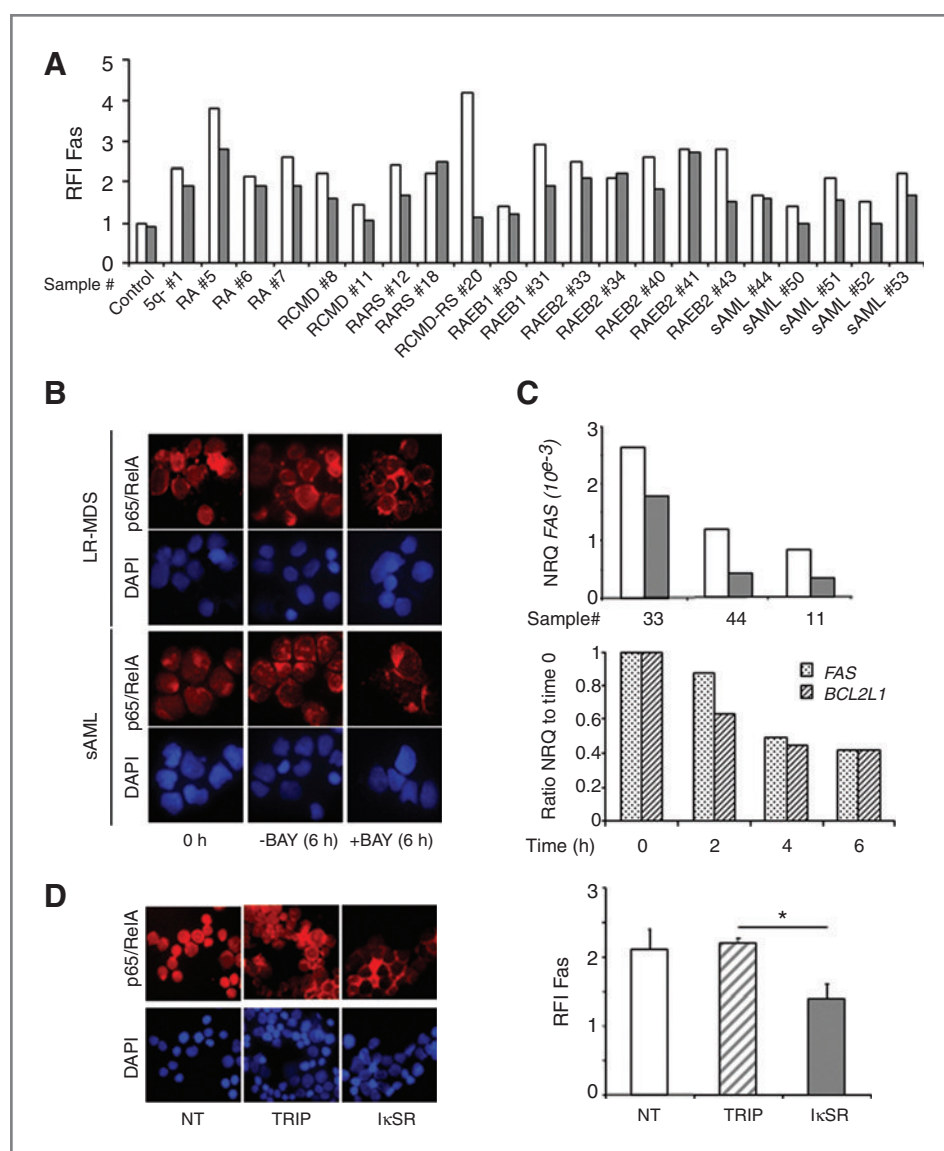
Azacitidine rescues p65/RelA-induced Fas expression in primary MDS/sAML cells

In primary bone marrow mononuclear cells, we used ChIP to explore the binding of p65/RelA to the chromatin at *FAS*

Figure 4. Fas expression on CD45^{lo}CD34⁺ MDS/AML cells is inversely correlated to the bone marrow (BM) blast count and remains low in AML cells after treatment with TNF- α . A, top, flow cytometry analysis of membrane Fas expression on CD45^{lo}CD34⁺ bone marrow cells in 22 patients with MDS (19 LR-MDS and 3 HR-MDS) at diagnosis (white bars) and at the time of progression (black bars). Results are expressed as RFI to isotypic control. Middle, bone marrow blast percentages. Right, inverse correlation between Fas expression and percentage of bone marrow blasts. B, AML blasts ($n = 4$) were treated for 6 hours with TNF- α (10 ng/mL) before study of p65/RelA subcellular localization by immunofluorescence, quantification of *FAS* or *BCL2L1* transcripts by quantitative real-time PCR (qPCR), without TNF- α (white bars), with TNF- α (hatched bars), and Fas or Bclx_L proteins measurement by flow cytometry. Results are expressed as NRQs or as RFI, respectively.

Figure 5. BAY11-7082 decreases Fas expression in MDS/AML CD34⁺ or mononuclear cells.

A, flow cytometry analysis of membrane Fas expression in MDS/sAML CD45^{lo}CD34⁺ cells before and after treatment with 5 μ mol/L BAY11-7082 for 6 hours. Results are expressed as a RFI to isotypic control. B, inhibition of p65/RelA nuclear localization by BAY11-7082 (5 μ mol/L for 6 hours) in MDS/AML ($n = 6$) mononuclear cells. Representative fluorescence microphotographs of p65/RelA labeling in 1 LR-MDS and 1 sAML. Nuclei are colored with DAPI. C, quantitative real-time PCR (qRT-PCR) for *FAS* and *BCL2L1* gene expression in MDS mononuclear cells treated or not with 5 μ mol/L of BAY11-7082 expressed as NRQ to *GAPDH* and *B2M* according to the ΔC_q method. D, NF- κ B pathway inhibition by lentiviral expression of I κ SR in MDS CD34⁺ cells. Infected cells were maintained for 3 days in cultures and then GFP⁺ cells were sorted and analyzed for p65/RelA subcellular localization by immunofluorescence (left) and Fas expression by flow cytometry (right). Results representative of 3 independent experiments.



promoter in 4 Fas-expressing (3 RAEB1 and 1 RAEB2) and 6 Fas-negative (1 RA, 1 RCMD-RS, and 4 sAML) MDS samples (threshold RFI = 1.7). We observed that the enrichment of p65/RelA at *FAS* promoter was null or very low in the 4 sAML and in 1 RCMD-RS, which did not express Fas, and was positive in all 4 Fas-positive LR-MDS. In one case, (RA#2), the expression of Fas was at the threshold of positivity in accordance with a poor binding of p65/RelA. Our data suggest that p65/RelA binding at *FAS* promoter is low in LR-MDS/AML. Although the number of samples available for ChIP experiment was limited, we found that the expression of Fas was proportional to the recruitment of p65/RelA at the gene promoter (Fig. 6A; $R^2 = 0.765$).

We have previously shown that DNA methylation of the *FAS* gene promoter correlated with low Fas expression in sAML, and that this promoter can be demethylated in patients

with MDS/AML treated with azacitidine (26). Here, bone marrow mononuclear or CD34⁺ cells from patients with sAML ($n = 11$) were cultured *in vitro* in the presence of TPO, IL-6, SCF, and FLT3L for 72 hours with or without 1 μ mol/L azacitidine. In these conditions, cells did not differentiate nor they died (not shown). Azacitidine efficiently rescued Fas receptor expression on bone marrow CD45^{lo}/CD34⁺ blast cells in the 7 Fas-negative cases, whereas the effect was weak in 2 Fas-positive cases (#14 and #47) and null in another Fas-positive case (#13; Fig. 6B). We then measured the methylation level of the CpGs in the -899 and +231 *FAS* promoter region in the purified CD34⁺ progenitors before and after azacitidine treatment for 2 patients. As shown in a representative experiment, azacitidine induced the demethylation of 14 of 16 CpG, including those located within NF- κ B-binding sites 1 and 3 (Fig. 6C). Second, we tested the effect of azacitidine on the binding of p65/RelA to

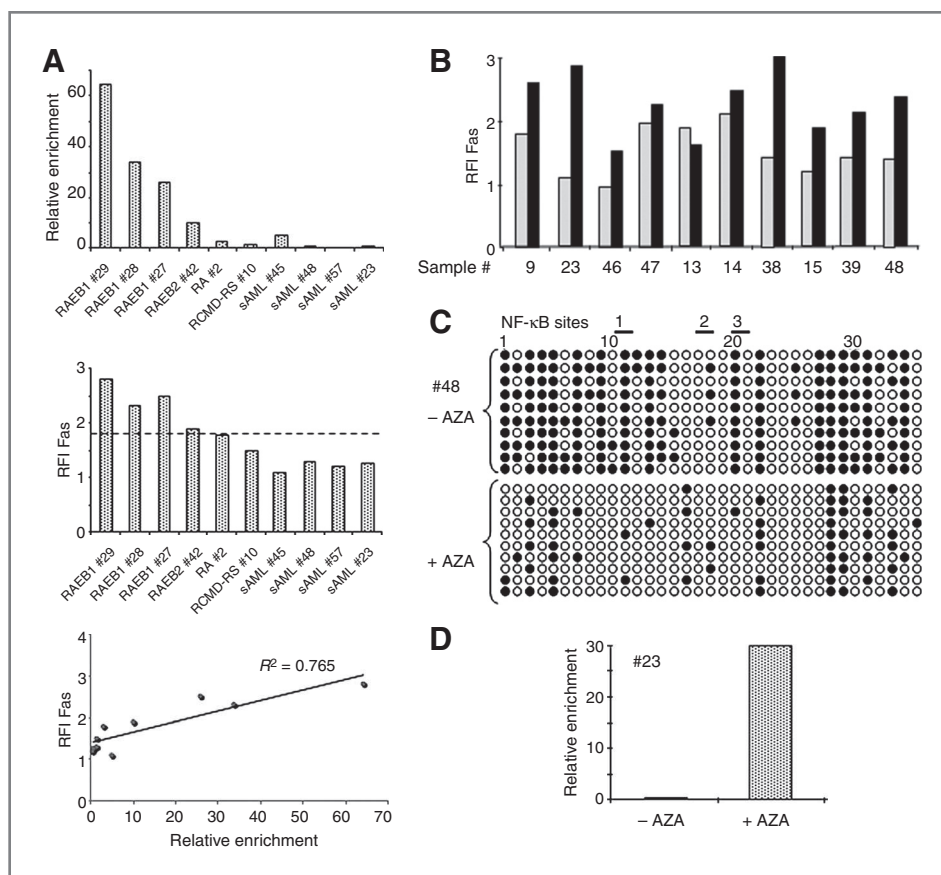


Figure 6. *In vitro* reinduction of *FAS* gene expression with azacitidine in MDS/AML. A, top, ChIP of p65/RelA at the *FAS* promoter in 10 MDS or sAML samples. Enrichment of p65/RelA compared with DNA input and control isotypic IgG. Middle, flow cytometry analysis of Fas receptor on bone marrow CD45^{lo}CD34⁺ progenitors. Results are expressed as RFI to isotypic control. Dotted line indicates the threshold of positivity for Fas expression in primary bone marrow samples. Bottom, correlation with Fas expression by flow cytometry. B, flow cytometry for Fas expression on bone marrow CD45^{lo}CD34⁺ progenitors before (white bars) and after (black bars) *in vitro* treatment with 1 μmol/L azacitidine for 3 days in 11 MDS/sAML samples. Results are expressed as a RFI to isotypic control. C, CpG methylation analysis. MDS/sAML CD34⁺ cells ($n = 2$) were treated for 3 days with 1 μmol/L azacitidine. Fas promoter was amplified on bisulfite-treated DNA from CD34⁺ cells. Amplicons were cloned in bacteria and sequenced (10 clones/sample). Black circles, fully methylated CpGs; open circles, unmethylated CpGs. D, ChIP of p65/RelA at *FAS* promoter ($n = 1$). Enrichment of p65/RelA compared with DNA input and control isotypic IgG.

FAS promoter in one case of sAML (#23) the before and after azacitidine treatment. We observed a dramatic increase of p65/RelA recruitment after treatment, suggesting that DNA demethylation may facilitate the docking of NF-κB transcription factor at *FAS* promoter in primary bone marrow mononuclear cells (Fig. 6D). Altogether, azacitidine can induce *FAS* promoter demethylation, thus facilitates p65/RelA binding and *FAS* gene transcription in myeloid cells.

Discussion

The present study shows that NF-κB directly promotes *FAS* gene expression in hematopoietic progenitor cells. In sAML, CpG methylation of NF-κB-binding sites at *FAS* promoter prevents p65/RelA binding to chromatin, which account for the gene and protein downregulation. Interestingly, this downregulation is reversible upon azacitidine therapy, leading to *FAS* gene reexpression.

NF-κB can promote cell survival through the transcriptional regulation of IAP (*X-IAP*, *cIAP1*, and *cIAP2*) or Bcl_{xL}

(*BCL2L1*) family members or cell proliferation through the upregulation of *CYCD1* and *c-MYC* (16, 27). NF-κB can also facilitate cell death through the death receptor-mediated extrinsic pathway (19, 20, 27). These dual pro- and antiapoptotic functions of NF-κB could apply to MDS. In LR-MDS, the NF-κB activity, which could be due to TNF-α secretion (28–31), may account for *FAS* gene expression. NF-κB pathway is constitutively activated when the disease progresses (12–16) and could suppress cell death through the transcriptional regulation of antiapoptotic genes. In addition, the methylation of promoters could turn off the NF-κB-dependent transcription of proapoptotic genes such as *FAS* (32).

The present study shows the direct upregulation of *FAS* gene expression by NF-κB in primary bone marrow cells. p65/RelA binds to the *FAS* gene promoter, whereas NF-κB inhibition with either BAY11-7082 (33) or the IκSR decreases Fas expression. The *FAS* gene has been shown previously to be a direct target for NF-κB in lymphocytes,

hepatocytes (6, 20), and various solid tumor cell types (11, 32). The cell context may be essential as NF- κ B activation through the alternate pathway could be a *FAS* transcription repressor in murine erythroleukemia (MEL) cells (34). Alternatively, the threshold of NF- κ B activity, which is under control of either the quantity of dimers p65/p65, p50/p50, and p65/p50 recruited to the chromatin or posttranslational modifications, or interactions with other transcription factors such as Sp1 could determine its effects (35, 36). For instance, while a high rate of activation could permit the transcription of a large spectrum of pro and antiapoptotic genes, low levels of activation could restrict the transcription to few proapoptotic genes. In our model of myeloid leukemogenesis, MDS at the beginning are characterized by inappropriate and excessive apoptosis linked to the upregulation of *FAS* gene expression. At this stage, NF- κ B activation is weak while it increases as the disease progresses to AML together with the upregulation of antiapoptotic genes such as *cIAPs*, *Bcl2* or downregulation of proapoptotic gene such as *FADD* (16, 21, 37). In addition, the NF- κ B consensus binding sequences play an important role in determining the specificity of the different active dimers and affect their interaction with transcription coactivators (38). This may suggest that either the threshold or the specificity of NF- κ B pathway could be crucial for cell fate decision between survival and death. Finally, the cell fate could depend on the epigenetic state of the chromatin at NF- κ B target gene promoters. Our previous and current data support this later hypothesis as *FAS* gene expression decreases along the progression of MDS to AML according to the increase of DNA methylation at *FAS* gene promoter (26). The *FAS* gene expression is also epigenetically regulated in neoplastic mast cells in which azacitidine or decitabine treatment induced caspase-dependent apoptosis through the reactivation of this gene (39).

In the *FAS* promoter of the colon carcinoma cell line SW480 or AML primary samples (22) methylated CpG are located in the CpG island around the TSS (−285 to +221) and in a 5′ region upstream of the CpG island (−899 to −286), both regions containing NF- κ B putative binding sites for transcription factors. Consequently, the binding of p65/RelA to chromatin is very low. Treatment with azacitidine rescues *Fas* expression, both at the transcript and protein levels by facilitating the binding of p65/RelA to the chromatin. p65/RelA binding to the chromatin is more important in low-grade MDS where the CpG methylation

is low compared with high-grade MDS in which the level of DNA methylation is high. Such an epigenetic regulation of NF- κ B—dependent transcription has been reported for *AIOLOS* gene in chronic lymphocytic leukemia (40).

Altogether, CpG methylation inhibits the binding of p65/RelA to *FAS* promoter and decreases *FAS* gene transcription in high-grade MDS and sAML, which may contribute to cell resistance to apoptosis and disease progression. The increase in the expression of *FAS* gene that we observed during the clinical use of azacitidine in 63 patients with MDS/AML could be used as a biomarker of the drug activity (26). It will be useful to determine whether this reexpression of *Fas* contributes to slow down the progression of the disease or constitutes a potential risk of treatment failure in a prospective clinical trial.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

M. Fontenay is a consultant/advisory board member of Celgene. No potential conflicts of interest were disclosed by the other authors.

Authors' Contributions

Conception and design: S. Etrou, E. Solary, M. Fontenay

Development of methodology: S. Etrou, C. Humbrecht, B. Benet, V. Mariot

Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): S. Etrou, C. Humbrecht, B. Benet, V. Mariot, O. Kosmider

Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): C. Humbrecht, D. d'Allard, M. Goodhardt, O. Kosmider, P. Mayeux

Writing, review, and/or revision of the manuscript: M. Goodhardt, P. Mayeux, E. Solary, M. Fontenay

Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): S. Etrou, K. Billot

Study supervision: M. Fontenay

Acknowledgments

The authors thank Drs. Véronique Baud (INSERM U1016, Institut Cochin), Hélène Jammes (Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Jouy en Josas) for helpful discussion, Prof. François Dreyfus and Dr. Sophie Park for enrolling patients, Dr. Rosa Sapena in charge of the French National Registry of MDS and therapy-related disorders for recording clinical data, Virginie Chesnais and Anna Raimbault for technical assistance.

Grant Support

This work was supported by a grant from the Direction Régionale de la Recherche Clinique AP-HP (PHRC MAD-06) and from the Cancéropôle Ile-de-France (FNS/ACI 2004 and PACI2007). S. Etrou was the recipient of a doctoral fellowship from the Cancéropôle Ile-de-France, C. Humbrecht was the recipient of a grant from the Association de Recherche contre le Cancer. D. d'Allard was the recipient of a grant from the Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received October 22, 2012; revised February 18, 2013; accepted March 14, 2013; published OnlineFirst April 19, 2013.

References

- Lavrik IN, Krammer PH. Regulation of CD95/Fas at the DISC. *Cell Death Differ* 2012;19:36–41.
- Bouillet P, O'Reilly LA. CD95, BIM and T cell homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2009;9:514–9.
- De Maria R, Zeuner A, Eramo A, Domenichelli C, Bonci D, Grignani F, et al. Negative regulation of erythropoiesis by caspase-mediated cleavage of GATA-1. *Nature* 1999;401:489–93.
- Rieux-laucat F, Fischer A, Deist FL. Cell-death signaling and human disease. *Curr Opin Immunol* 2003;15:325–31.
- Maecker HL, Yun Z, Maecker HT, Giaccia AJ. Epigenetic changes in tumor *Fas* levels determine immune escape and response to therapy. *Cancer Cell* 2002;2:139–48.
- Ouaaz F, Li M, Beg AA. A critical role for the RelA subunit of nuclear factor kappaB in regulation of multiple immune-response genes and in *Fas*-induced cell death. *J Exp Med* 1999;189:999–1004.
- Zheng Y, Ouaz F, Bruzzo P, Singh V, Gerondakis S, Beg AA. NF-kappa B RelA (p65) is essential for TNF-alpha-induced *fas* expression

- but dispensable for both TCR-induced expression and activation-induced cell death. *J Immunol* 2001;166:4949–57.
8. Karin M, Yamamoto Y, Wang QM. The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development. *Nat Rev Drug Discov* 2004;3:17–26.
 9. Chen ZJ, Parent L, Maniatis T. Site-specific phosphorylation of IkkappaBalpha by a novel ubiquitination-dependent protein kinase activity. *Cell* 1996;84:853–62.
 10. Delhase M, Hayakawa M, Chen Y, Karin M. Positive and negative regulation of IkkappaB kinase activity through IKKbeta subunit phosphorylation. *Science* 1999;284:309–13.
 11. Rayet B, Gelinas C. Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene* 1999;18:6938–47.
 12. Griessinger E, Imbert V, Lagadec P, Gonthier N, Dubreuil P, Romanelli A, et al. AS602868, a dual inhibitor of IKK2 and FLT3 to target AML cells. *Leukemia* 2007;21:877–85.
 13. Guzman ML, Neering SJ, Upchurch D, Grimes B, Howard DS, Rizzieri DA, et al. Nuclear factor-kappaB is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells. *Blood* 2001;98:2301–7.
 14. Bueso-Ramos CE, Rocha FC, Shishodia S, Medeiros LJ, Kantarjian HM, Vadhan-Raj S, et al. Expression of constitutively active nuclear-kappa B RelA transcription factor in blasts of acute myeloid leukemia. *Hum Pathol* 2004;35:246–53.
 15. Kerbaui DM, Lesnikov V, Abbasi N, Seal S, Scott B, Deeg HJ. NF-kappaB and FLIP in arsenic trioxide (ATO)-induced apoptosis in myelodysplastic syndromes (MDSs). *Blood* 2005;106:3917–25.
 16. Braun T, Carvalho G, Coquelle A, Vozenin MC, Lepelletier P, Hirsch F, et al. NF-kappaB constitutes a potential therapeutic target in high-risk myelodysplastic syndrome. *Blood* 2006;107:1156–65.
 17. Jennewein C, Karl S, Baumann B, Micheau O, Debatin KM, Fulda S. Identification of a novel pro-apoptotic role of NF-kB in the regulation of TRAIL- and CD95-mediated apoptosis of glioblastoma cells. *Oncogene* 2012;31:1468–74.
 18. Radhakrishnan SK, Kamalakaran S. Pro-apoptotic role of NF-kappaB: implications for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta* 2006;1766:53–62.
 19. Chan H, Bartos DP, Owen-Schaub LB. Activation-dependent transcriptional regulation of the human Fas promoter requires NF-kappaB p50-p65 recruitment. *Mol Cell Biol* 1999;19:2098–108.
 20. Kuhnel F, Zender L, Paul Y, Tietze MK, Trautwein C, Manns M, et al. NFkappaB mediates apoptosis through transcriptional activation of Fas (CD95) in adenoviral hepatitis. *J Biol Chem* 2000;275:6421–7.
 21. Parker JE, Mufti GJ, Rasool F, Mijovic A, Devereux S, Pagliuca A. The role of apoptosis, proliferation, and the Bcl-2-related proteins in the myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia secondary to MDS. *Blood* 2000;96:3932–8.
 22. Boudard D, Vasselon C, Berthéas MF, Jaubert J, Mounier C, Reynaud J, et al. Expression and prognostic significance of Bcl-2 family proteins in myelodysplastic syndromes. *Am J Hematol* 2002;70:115–25.
 23. Gyan E, Frisan E, Beyne-Rauzy O, Deschemin JC, Pierre-Eugene C, Randriamampita C, et al. Spontaneous and Fas-induced apoptosis of low-grade MDS erythroid precursors involves the endoplasmic reticulum. *Leukemia* 2008;22:1864–73.
 24. Slaughter CI, Saw J, Jowett JB, Aplan PD, Strasser A, Jane SM, et al. Inhibition of apoptosis by BCL2 prevents leukemic transformation of a murine myelodysplastic syndrome. *Blood* 2012;120:2475–83.
 25. Claessens YE, Park S, Dubart-Kupperschmitt A, Mariot V, Garrido C, Chrétien S, et al. Rescue of early-stage myelodysplastic syndrome-deriving erythroid precursors by the ectopic expression of a dominant-negative form of FADD. *Blood* 2005;105:4035–42.
 26. Ettou S, Audureau E, Humbrecht C, Benet B, Jammes H, Clozel T, et al. Fas expression at diagnosis as a biomarker of azacitidine activity in high-risk MDS and secondary AML. *Leukemia* 2012;28:2297–9.
 27. Kucharczak J, Simmons MJ, Fan Y, Gelinas C. To be, or not to be: NF-kappaB is the answer—role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis. *Oncogene* 2003;22:8961–82.
 28. Sanz C, Richard C, Prosper F, Fernandez-Luna JL. Nuclear factor kB is activated in myelodysplastic bone marrow cells. *Haematologica* 2002;87:1005–6.
 29. Shetty V, Mundle S, Alvi S, Showel M, Broady-Robinson L, Dar S, et al. Measurement of apoptosis, proliferation and three cytokines in 46 patients with myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 1996;20:891–900.
 30. Kitagawa M, Saito I, Kuwata T, Yoshida S, Yamaguchi S, Takahashi M, et al. Overexpression of tumor necrosis factor (TNF)-alpha and interferon (IFN)-gamma by bone marrow cells from patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 1997;11:2049–54.
 31. Maciejewski J, Selleri C, Anderson S, Young NS. Fas antigen expression on CD34⁺ human marrow cells is induced by interferon gamma and tumor necrosis factor alpha and potentiates cytokine-mediated hematopoietic suppression *in vitro*. *Blood* 1995;85:3183–90.
 32. Santourlidis S, Warskulat U, Flori AR, Maas S, Pulte T, Fischer J, et al. Hypermethylation of the tumor necrosis factor receptor superfamily 6 (APT1, Fas, CD95/Apo-1) gene promoter at rel/nuclear factor kappaB sites in prostatic carcinoma. *Mol Carcinog* 2001;32:36–43.
 33. Dai Y, Pei XY, Rahmani M, Conrad DH, Dent P, Grant S. Interruption of the NF-kappaB pathway by Bay 11-7082 promotes UCN-01-mediated mitochondrial dysfunction and apoptosis in human multiple myeloma cells. *Blood* 2004;103:2761–70.
 34. Liu F, Bardhan K, Yang D, Thangaraju M, Ganapathy V, Liles G, et al. NF-kB directly regulates Fas transcription to modulate Fas-mediated apoptosis and tumor suppression. *J Biol Chem* 2012;287:25530–40.
 35. Hirano F, Tanaka H, Hirano Y, Hiramoto M, Handa H, Makino I, et al. Functional interference of Sp1 and NF-kappaB through the same DNA binding site. *Mol Cell Biol* 1998;18:1266–74.
 36. Campbell KJ, Perkins ND. Post-translational modification of RelA(p65) NF-kappaB. *Biochem Soc Trans* 2004;32(Pt 6):1087–9.
 37. Tournier L, Delluc S, Levy V, Valensi F, Radford-Weiss I, Legrand O, et al. Absence or low expression of fas-associated protein with death domain in acute myeloid leukemia cells predicts resistance to chemotherapy and poor outcome. *Cancer Res* 2004;64:8101–8.
 38. Leung TH, Hoffmann A, Baltimore D. One nucleotide in a kappaB site can determine cofactor specificity for NF-kappaB dimers. *Cell* 2004;118:453–64.
 39. Ghanim V, Herrmann H, Heller G, Peter B, Hadzijušević E, Blatt K, et al. 5-Azacitidine and decitabine exert proapoptotic effects on neoplastic mast cells: role of FAS-demethylation and FAS re-expression, and synergism with FAS-ligand. *Blood* 2012;119:4242–52.
 40. Billot K, Soeur J, Chereau F, Arrouss I, Merle-Beral H, Huang ME, et al. Deregulation of Aiolos expression in chronic lymphocytic leukemia is associated with epigenetic modifications. *Blood* 2011;117:1917–27.

RESUME

L'érythropoïèse est le processus qui permet à la production d'hématies à partir d'une cellule souche hématopoïétique. La différenciation érythroïde implique des changements morphologiques, en partie liés à la perte d'expression membranaire du récepteur à activité tyrosine kinase de classe III, c-Kit. En réponse à son ligand, le SCF, c-Kit est activé puis internalisé et dégradé par la voie du protéasome, via l'ubiquitine E3-ligase c-Cbl, ou par la voie lysosomale suite à une endocytose.

Dans la première partie de ce travail, nous avons pu mettre en évidence qu'en absence de SCF et en réponse à un inhibiteur de tyrosine kinase, l'imatinib, les érythroblastes cultivés *ex vivo* perdent l'expression membranaire de c-Kit et accélèrent leur entrée en différenciation terminale. Au vu de ces observations, nous avons cherché à comprendre les mécanismes impliqués. Sur un modèle de cellules érythroleucémiques dépendantes de l'érythropoïétine, mais exprimant de manière endogène c-Kit, nous avons montré que l'imatinib induit une internalisation du récepteur ainsi que sa dégradation par la voie lysosomale et de manière indépendant de c-Cbl. De plus, nous avons montré que cet effet est réversible et que l'imatinib ne bloque pas la réexpression de c-Kit après son internalisation en réponse au SCF. Des marquages métaboliques ont permis de montrer que l'imatinib ne modifie ni la synthèse ni la maturation de c-Kit et que le profil phospho-tyrosine des cellules traitées à l'imatinib est globalement inchangé. Enfin, nous avons montré que la fixation de l'imatinib à la poche catalytique de c-Kit est indispensable à son internalisation, et par conséquent à sa dégradation. Il apparaît donc que l'imatinib lève l'auto-inhibition de c-Kit, qui semble nécessaire pour son maintien à la membrane.

Dans la seconde partie de ce travail, nous nous sommes intéressés aux changements morphologiques subis par les nucléoles, lieu de la biogenèse des ribosomes, au cours de différenciation des érythroblastes. L'étude de la taille et du potentiel prolifératif des cellules, ainsi que l'analyse morphologique des nucléoles, nous a permis de confirmer que la réduction de taille des cellules est contemporaine d'un ralentissement de leur prolifération ainsi que de la réduction du volume et de la surface du composé granulaire (CG), « matrice » du nucléole. En microscopie électronique, nous montrons la persistance des CG en fin de maturation. Enfin, nous avons également étudié l'évolution des nucléoles dans un contexte pathologique de syndromes myélodysplasiques de faible risque, qui se caractérisent par une hématopoïèse inefficace. Nous observons que les cellules pathologiques immatures ont des CG plus volumineux que les cellules normales immatures, et qu'au cours de la différenciation, la morphologie des nucléoles est identique entre les cellules normales et pathologiques.

En conclusion, ce travail a permis de décrire 1) le mécanisme d'internalisation d'un récepteur à activité tyrosine kinase de classe III, c-Kit par un inhibiteur de tyrosine kinase, l'imatinib et 2) la morphologie du nucléole au cours de la différenciation érythroïde normale et pathologique des syndromes myélodysplasiques de faible risque.

Mots clés : différenciation érythroïde – c-Kit – imatinib – nucléoles – SMD